recherche et développement

Étude de faisabilité de l'évaluation toxicoloqique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier

RD - 86 - 02

Québec

88-04320/

Étude de faisabilité de l'évaluation toxicoloqique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier

RD - 86 - 02

par

Michel Sylvestre

Suzanne Blais

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

pour les:

Direction des eaux souterraines et de consommation

Direction des laboratoires

Direction de la recherche

Ministère de l'Environnement du Québec

Juin 1986

Dépôt légal - 2e trimestre 1987
Bibliothèque nationale du Québec
Bibliothèque nationale du Canada
ISBN 2-550-17657-X

Envirodoq 870010

CADRE DE RÉALISATION

Le ministère de l'Environnement du Québec a confié à l'Institut Armand-Frappier le mandat d'identifier les moyens d'évaluer la toxicité des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier. Ceci s'insère dans une démarche du Ministère visant d'une part à déterminer si l'eau provenant de l'usine de traitement peut être utilisable à des fins de consommation humaine ou à des fins agricoles.

Plus précisément, les objectifs du contrat étaient de:

- répertorier les cas historiques de contamination d'aquifère ou de source d'eau potable par des substances organiques où des analyses toxicologiques ont servi à la prise de décision, ainsi que les procédures en usage dans les industries pharmaceutiques et alimentaires pour évaluer la toxicité de nouveaux produits destinés à la consommation humaine;

- répertorier les tests biologiques ou biochimiques utilisables pour démontrer qu'une eau est potable ou utilisable à des fins agricoles, l'accent portant sur les effets à moyen ou long terme et la toxicité étant prise dans un sens large incluant les effets mutagène, cancérigène et tératogène;

- décrire le fonctionnement des tests préconisés et établir la complémentarité des tests entre eux;

- indiquer si les tests tiennent compte des effets toxiques synergiques et discuter des critères qui permettent le transfert des résultats de

l'organisme testé à l'organisme humain, ceci en considérant de façon particulière le niveau de risque pour l'humain, ainsi que les différentes concentrations d'une substance toxique dans l'eau et celles utilisées pour le test;

- proposer les exigences pour que ces tests soient crédibles dans le cas de la ville de Mercier: proposer le protocole d'échantillonnage et de conservation des échantillons, le mode et le facteur de concentration des substances chimiques dans l'échantillon, le nombre de repliquats devant être réalisé;

- présenter une grille de sélection de tests qui tienne compte des coûts, des temps de réponse et du degré de confiance des résultats en rapport avec la toxicité des contaminants envers la santé humaine;

- enfin, identifier les secteurs peu développés nécessitant de la recherche et du développement.

L'étude de faisabilité de l'évaluation toxicologique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier a été réalisée grâce à l'aide financière du ministère de l'Environnement du Québec. Messieurs Michel Goulet, Marcel Sylvestre et Jean Trottier du ministère ont participé à l'orientation des travaux.

LISTE DES PARTICIPANTS

Michel Sylvestre, Ph.D.
-Professeur, C.R.B., Institut Armand-Frappier

Suzanne Brais, B.Sc.
-Étudiante stagiaire de l'UQAM, en sciences de l'environnement

Avec l'assistance de:
Manon Hamel, B.Sc.
Étudiante en sciences de l'environnement

Diane Sauvé, B.Sc., M. Bibl.
-Bibliothécaire

LISTE DES PERSONNES CONSULTÉES

Bull, Richard, Ph.D.
U.S. EPA, Cincinatti, Ohio

Cotruvo, Joseph, Ph.D.
U.S. EPA, Washington, D.C.

Kopfler, C. Frederick, Ph.D.
U.S. EPA, Cincinatti, Ohio

LeBel, Guy, Ph.D.
Santé et Bien-être, Canada

Neals, Robert, A., Ph.D.
Univ. Vanderbilt, Nashville, Tennessee

Portelance, Vincent, Ph.D.
Directeur, Centre de recherche en bactériologie
Institut Armand-Frappier

Quevillon, Marc, Ph.D.
Directeur, Contrôle de la qualité
Institut Armand-Frappier

Stanley, Elaine, Ph.D.
Superfunds Office
US EPA, Washington, D.C.

Toft, Peter, Ph.D.
Santé et Bien-être, Canada

Vézina, Claude, Ph.D.
Directeur-adjoint
Institut Armand-Frappier

RÉFÉRENCE POUR CITER CE DOCUMENT

Sylvestre, M. et S. Brais (1986). Étude de faisabilité de l'évaluation toxicologique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier. Institut Armand-Frappier pour le Ministère de l'Environnement du Québec, rapport no RD-86-02, 140 pages et 7 annexes.

Mots clés:

eau souterraine, toxicité, micropolluants, mutagénicité, cancérogénicité, génotoxicité, test de Ames, ville de Mercier, Québec.

RÉSUMÉ

Notre étude avait pour but de recommander au ministère de l'Environnement des méthodes de choix pour s'assurer que l'eau traitée de la ville de Mercier peut être utilisée de façon acceptable pour la consommation humaine.

Dans un premier temps, nous avons répertorié les cas semblables à ceux de la ville de Mercier en vue de trouver des exemples de décisions prises, sur lesquels le Ministère aurait pu fonder ses propres décisions. Malheureusement, il n'en existe pas à ce jour, qui soit réglé de façon satisfaisante.

Il existe deux approches pour régler un cas comme celui de la ville de Mercier. Nous recommandons l'alternative qui consiste à établir la toxicité de ces eaux envers les animaux et à extrapoler les résultats pour l'homme.

Cependant, à cause de la complexité du mélange et des coûts exorbitants que nécessitent les tests de longue durée chez les animaux, nous avons proposé comme ce fut fait pour les eaux recyclées par le "National Research Council" des États-Unis (1982), d'effectuer d'abord une batterie de tests de toxicité rapides pour s'assurer que le traitement élimine la plus grande partie des microtoxiques présents dans l'eau brute. Ces tests permettent également d'établir un suivi de l'évolution du traitement des eaux de la ville de Mercier.

Pour ces études préliminaires, nous suggérons de faire appel aux tests de toxicité in vitro.

Il existe un très grand nombre de tests de toxicité in vitro. Nous avons répertorié des exemples de chaque catégorie. Le rapport présente des exemples de chacun des types de test de génotoxicité répertoriés dans

RÉFÉRENCE POUR CITER CE DOCUMENT

Sylvestre, M. et S. Brais (1986). Étude de faisabilité de l'évaluation toxicologique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier. Institut Armand-Frappier pour le Ministère de l'Environnement du Québec, rapport no RD-86-02, 140 pages et 7 annexes.

Mots clés:

eau souterraine, toxicité, micropolluants, mutagénicité, cancérogénicité, génotoxicité, test de Ames, ville de Mercier, Québec.

RÉSUMÉ

Notre étude avait pour but de recommander au ministère de l'Environnement des méthodes de choix pour s'assurer que l'eau traitée de la ville de Mercier peut être utilisée de façon acceptable pour la consommation humaine.

Dans un premier temps, nous avons répertorié les cas semblables à ceux de la ville de Mercier en vue de trouver des exemples de décisions prises, sur lesquels le Ministère aurait pu fonder ses propres décisions. Malheureusement, il n'en existe pas à ce jour, qui soit réglé de façon satisfaisante.

Il existe deux approches pour régler un cas comme celui de la ville de Mercier. Nous recommandons l'alternative qui consiste à établir la toxicité de ces eaux envers les animaux et à extrapoler les résultats pour l'homme.

Cependant, à cause de la complexité du mélange et des coûts exorbitants que nécessitent les tests de longue durée chez les animaux, nous avons proposé comme ce fut fait pour les eaux recyclées par le "National Research Council" des États-Unis (1982), d'effectuer d'abord une batterie de tests de toxicité rapides pour s'assurer que le traitement élimine la plus grande partie des microtoxiques présents dans l'eau brute. Ces tests permettent également d'établir un suivi de l'évolution du traitement des eaux de la ville de Mercier.

Pour ces études préliminaires, nous suggérons de faire appel aux tests de toxicité in vitro.

Il existe un très grand nombre de tests de toxicité in vitro. Nous avons répertorié des exemples de chaque catégorie. Le rapport présente des exemples de chacun des types de test de génotoxicité répertoriés dans

la littérature. Nous les avons évalués en fonction de leur valeur prédictive pour déceler des cancérogènes, leur popularité dans les laboratoires de toxicologie et leur emploi dans des analyses de toxicité d'échantillons d'eau potable contaminée par des micropolluants.

Le rapport présente une discussion sur les modèles d'extrapolation à l'humain des résultats d'analyse de toxicité. L'extrapolation de l'animal à l'homme est généralement acceptée par les organismes se préoccupant de la santé humaine, mais nos connaissances actuelles sont trop limitées pour nous permettre d'extrapoler à l'homme les résultats de tests de toxicité in vitro. Toutefois, les résultats de ces dernières analyses pourraient certainement nous fournir des renseignements utiles, entre autres sur la progression de la décontamination de la nappe souterraine de la ville de Mercier et sur l'intérêt de poursuivre les études de toxicité chez les animaux pour s'assurer que l'eau traitée peut être acceptable pour la consommation humaine. En effet, la détection d'une forte activité mutagène par les tests in vitro permettrait au Ministère de ne pas entreprendre inutilement des études de toxicité de longue durée chez les animaux.

De toute manière, pour permettre une extrapolation des résultats il est nécessaire de pouvoir concentrer les constituants solides de l'eau. Nous avons également répertorié les méthodes de concentration utiles dans ce cas et les avons évaluées en fonction de leur potentiel d'application pour l'analyse des eaux de la ville de Mercier.

Enfin, nous avons suggéré un protocole, fondé sur l'évaluation que nous avons faite des tests de toxicité et des méthodes de concentration ainsi que sur le protocole recommandé par l'EPA pour l'évaluation de l'acceptabilité pour consommation humaine d'eaux contaminées par des micropolluants.

Dans un premier temps, nous recommandons de concentrer les micropolluants susceptibles d'être mutagènes en les fractionnant par chromatographie sur résine XAD.

De toute évidence, le test de choix pour évaluer la génotoxicité in vitro est le test de Ames qui a déjà été utilisé pour l'évaluation de l'activité mutagène d'eau traitée de villes canadiennes et d'autres pays.

Toutefois, dans un deuxième temps, à cause de l'incapacité de chaque test in vitro à détecter tous les cancérogènes et à cause de la complexité du mélange à analyser (il est impossible d'établir une corrélation entre l'activité mutagénique in vitro d'un mélange complexe du micropolluants et son activité oncogène in vivo) nous suggérons aussi dans le cas de la ville de Mercier de réaliser des essais de génotoxicité in vitro employant des cellules animales (tests de mutagénicité et transformation cellulaire). Enfin, si cette batterie de tests in vitro révélait l'absence de mutagènes détectables, il faudrait en dernier essor effectuer des tests de toxicité chez les animaux. Ces tests devraient alors être effectués avec des concentrats préparés par lyophilisation ou osmose inversée et l'extrapolation des résultats chez l'homme devrait être effectuée selon le modèle de Crumps (modifié par l'EPA).

Enfin, si le Ministère jugeait à propos d'utiliser l'eau traitée de la ville de Mercier pour irriguer des terres agricoles, nous avons présenté un certain nombre de suggestions relatives aux aspects de recherche qui devraient être développés. Il faudra entre autre vérifier si le sol de la région retient les micropolluants ou s'il permet leur translocation vers les plantes.

Malheureusement, à notre connaissance, il n'existe pas de normes ni au Québec ni ailleurs concernant la qualité des eaux pouvant servir à des fins d'irrigation.

TABLE DES MATIÈRES

CADRE DE RÉALISATION i

LISTE DES PARTICIPANTS iii

RÉFÉRENCE POUR CITER CE DOCUMENT iv

RÉSUMÉ v

TABLE DES MATIÈRES ix

LISTE DES ANNEXES xiii

LISTE DES FIGURES xiv

LISTE DES TABLEAUX xv

Chapître 1: INTRODUCTION

1.1 Problématique et objectif du rapport 1

Chapître 2: RÉPERTOIRE DES CAS SEMBLABLES À CEUX DE LA VILLE DE MERCIER

2.0 Résumé 3

2.1 Stratégie de recherche adoptée 3

2.2 Modèles d'eaux potables contaminées qui sont citées dans la littérature 7

2.3 Exemples connus d'eaux recyclées 8

Chapître 3: MÉTHODES D'ANALYSE DE LA TOXICITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES

3.0 Résumé 9

3.1 Description des différents systèmes biologiques pouvant servir à évaluer la toxicité des produits chimiques 10

3.1.1 Essais chez les animaux 10

3.1.1.1 Animaux généralement utilisés 10

3.1.1.2 Protocole général pour le test de toxicité animale utilisé en industrie pharmaceutique et alimentaire 11

3.1.1.2.1 Généralités 12
3.1.1.2.2 Test de toxicité aiguë 13
3.1.1.2.3 Toxicité subaiguë 14
3.1.1.2.4 Test de toxicité chronique 15

3.1.1.3 Méthodes d'extrapolation de la toxicité chez l'homme 17

3.1.1.3.1 Généralités 18
3.1.1.3.2 Seuil de tolérance et facteur de risque 19
3.1.1.3.3 Extrapolation des faibles doses et expression en terme de dose par unité de surface corporelle 21

3.1.2 Essais de toxicité rapide in vitro 30

3.1.2.1 Cytoxicité 30

3.1.2.1.1 Bioessai avec bactéries, test microtox 30
3.1.2.1.2 Bioessai avec algues 31
3.1.2.1.3 Bioessai avec cellules de mammifères 31

3.1.2.2 Génotoxicité 32

3.1.2.2.1 Description sommaire des différentes méthodes rapides de détection in vitro de mutagènes 33
3.1.2.2.2 Crédibilité des tests rapides in vitro de génotoxicité pour la détection des produits oncogènes 38

3.2 Tests effectués dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire pour déterminer la toxicité de nouveaux produits. 48

3.3 Utilisation des tests de toxicité pour l'analyse des eaux. 49

3.4 Conclusion 53

Chapître 4: RÉPERTOIRE DES MÉTHODES DE CONCENTRATION DES MICROPOLLUANTS DE L'EAU

4.0 Résumé 59

4.1 Généralités 59

4.2 Méthodes de concentration proprement dites 60

4.2.1 Concentration par congélation 60

4.2.2 Lyophilisation 62

4.2.3 Évaporation ou distillation sous vide 63

4.2.4 Osmose inversée 63

4.3	Méthodes de concentration par enrichissement	64
	4.3.1 Extraction par solvants organiques	64
	4.3.2 Méthode de concentration par adsorption et élution	65
	4.3.2.1 Charbon activé	65
	4.3.2.2 Résine adsorbante macroréticulaire	65
4.4	Méthodes de concentration mixtes	66
	4.4.1 Procédure de Kopler et al. (1977)	67
	4.4.2 Procédure de Johnston et al. (1980)	67
	4.4.3 Procédure de Baird et al. (1980)	67
	4.4.4 Procédure de Cabridenc et Sidka (1979)	68
	4.4.5 Concentration par HPLC utilisant une colonne de chromatographie C18 en phase inversée.	68
Chapître 5:	MESURES PROPOSÉES PAR L'ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) DES ÉTATS-UNIS POUR ÉVALUER LA TOXICITÉ ET LES RISQUES DE CONSOMMATION D'EAUX POTABLES ET D'EAUX RECYCLÉES	
5.0	Résumé	71
5.1	Stratégie pour l'évaluation de la toxicité	73
5.2	Méthodes d'extrapolation suggérées par l'EPA pour assurer une qualité acceptable pour l'homme des eaux de consommation susceptibles d'être contaminées par des mélanges complexes de micropolluants toxiques	75
5.3	Méthodes de concentration retenues par l'EPA	77
Chapître 6:	PROPOSITION D'UN PROTOCOLE POUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EAUX DE LA VILLE DE MERCIER ET ÉVALUATIONDES MÉTHODES PROPOSÉES BASÉES SUR LES DONNÉES SCIENTIFIQUES ACTUELLEMENT DISPONIBLES	
6.0	Résumé	79
6.1	Protocole général	85
6.2	Détail du protocole	90
	6.2.2 Méthode de concentration	90
	6.2.2.1 Colonne de verre	90
	6.2.2.2 Cartouche de métal	91

6.2.3 Tests de toxicité in vitro 93

6.2.3.1 Espace physique, ressources humaines et élimination des déchets 93

6.2.3.2 Test de Ames 94

6.2.3.2.1 Principes 94
6.2.3.2.2 Matériel requis 96
6.2.3.2.3 Méthode 97
6.2.3.2.4 Lecture des résultats 98
6.2.3.2.5 Variations du test de Ames 99

6.2.3.3 Test de mutagénicité, mutation au locus HGPRT avec des cellules V79 de hamster chinois (Arlette, 1977) 100

6.2.3.3.1 Matériel requis 100

6.2.3.3.2 Méthode 101

6.2.3.3.2.1 Milieu de culture complet 101
6.2.3.3.2.2 Milieu de suspension pour traitement 101
6.2.3.3.2.3 Cultures cellulaires 101
6.2.3.3.2.4 Conservation des cultures par congélation 101
6.2.3.3.2.5 Tests de toxicité 102
6.2.3.3.2.6 Test de mutagénicité 102
6.2.3.3.2.7 Lectures des résultats 103

6.2.3.4 Test de transformation cellulaire in vitro (Style, 1977, 1981) 104

6.2.3.4.1 Matériel requis 104
6.2.3.4.2 Souches 104
6.2.3.4.3 Méthode 105

6.2.3.4.3.1 Milieu de culture 105
6.2.3.4.3.2 Cultures cellulaires 105
6.2.3.4.3.3 Congélation des cultures 105
6.2.3.4.3.4 Test de transformation 106
6.2.3.4.3.5 Test de toxicité 106
6.2.3.4.3.6 Quantification de la transformation 107
6.2.3.4.3.7 Témoins de cellules transformées 107

6.2.4 Quantité de matériel requis pour les tests de toxicité 107

6.2.5 Toxicité in vivo 109

Chapître 7: SECTEURS DE RECHERCHE À DÉVELOPPER 11

Chapître 8: CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 11

RÉFÉRENCES 12

LISTE DES ANNEXES

		Page
Annexe 1 :	Expression mathématique des courbes dose-réponse.	141
Annexe 2 :	Description des tests rapides de génotoxicité et cancérogénicité disponibles à ce jour.	151
Annexe 3 :	Caractéristiques des résines XAD.	191
Annexe 4 :	Protocole du NRC (1982) pour analyser la toxicité d'une eau contaminée par un mélange complexe de micropolluants.	215
Annexe 5 :	Précisions concernant le test de Ames.	221
Annexe 6 :	Maron et Ames, 1983.	229
Annexe 7 :	Protocole d'analyse de toxicité in vivo recommandé par le "NRC" (1982).	233

LISTE DES FIGURES

Fig. III - 1 : Étapes biologiques du développement de néoplasmes. 23

Fig. VI - 1 : Protocole d'évaluation de la toxicité des eaux de la ville de Mercier. 80

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1 : Tests de génotoxicité. 34

TABLEAU 3.2 : Corrélation entre le test de Ames et les tests d'oncogénicité chez les animaux. 40

TABLEAU 3.3 : Relation entre la strucutre chimique des carcinogènes et leurs détections par le test de Ames. 42

TABLEAU 3.4 : Valeur prédictive et coût des tests de mutagénicité in vitro les plus couramment employés. 47

TABLEAU 4.1 : Méthodes de concentration des micropolluants de l'eau. 61

TABLEAU 6.1 : Volume d'eau requis pour effectuer les tests de génotoxicité in vitro. 108

Chapitre 1

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous présentons l'objectif du projet qui est de rechercher des moyens d'évaluer la toxicité des eaux traitées de la ville de Mercier afin de déterminer, en toute éventualité, leur acceptabilité pour de fins de consommation humaine ou agricole.

1.1. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU RAPPORT

Le problème de la contamination des eaux souterraines de la ville de Mercier a été présenté dans le rapport que la firme Hydrogeo Canada inc. a soumis au ministère de l'Environnement du Québec en 1981 (Ministère de l'Environnement du Québec 1981). En résumé, un déversement prolongé de polluants toxiques et récalcitrants à la biodégradation dans un bassin localisé sur un sol poreux a conduit à une importante accumulation de ces toxiques dans la nappe d'eau sous-jacente. Cette eau servait d'approvisionnement pour les habitants du rang Sainte-Marguerite à la ville de Mercier.

Une usine de traitement des eaux ayant pour objectif de décontaminer la nappe aquifère en vue de réduire le déplacement des contaminants vers des secteurs non affectés est présentement en fonction. Le présent rapport s'inscrit dans un projet de rationalisation des équipements du Gouvernement qui cherche à connaître si l'usine de traitement actuelle pourrait servir, en toute éventualité, lorsque la nappe sera suffisamment décontaminée, à alimenter en eau les municipalités avoisinantes pour consommation humaine ou agricole. L'objectif du présent rapport est de rechercher des moyens d'évaluer la toxicité des eaux traitées afin de déterminer leur utilisation acceptable pour ces fins.

Chapitre 2

RÉPERTOIRE DES CAS SEMBLABLES À CEUX DE LA VILLE DE MERCIER

2.0 RÉSUMÉ

Dans ce chapitre, nous énumérons d'abord les principales sources d'informations qui nous ont permis de compléter ce rapport. Malheureusement, il a été impossible de retracer des cas identiques à ceux de la ville de Mercier. Cependant, dans les sections 2.2 et 2.3, nous présentons des exemples d'eaux recyclées dont les critères, suggérés par "Environmental Protection Agency" pour le réemploi d'eaux contaminées, peuvent servir de critères de base pour les eaux de la ville de Mercier.

2.1 STRATÉGIE DE RECHERCHE ADOPTÉE

Dans cette section nous décrirons la stratégie que nous avons adoptée pour répertorier les cas semblables à ceux de la ville de Mercier.

Dans un premier temps, nous avons fait une recherche des cas publiés, ou des rapports gouvernementaux utilisant les banques informatisées disponibles. Nous avons entre autres consulté:

1) Conference papers Index
2) CA Search (Chem. Abst. Service)

3) Medline (National Library of Medicine)

4) NTIS (National Technical Information Service)

5) Envirodoq (Centre de documentation du ministère de l'Environnement du Québec)

6) Biosis Previews (Biosciences Information Service)

Cette première recherche ne nous a pas permis de repérer des cas publiés identiques à ceux de la ville de Mercier. Nous avons cependant retenu quelques rapports d'agences gouvernementales (américaines en particulier) "Environmental Protection Agency" et "National Research Council" qui traitaient des critères d'acceptabilité pour l'eau de consommation. Ces rapports ont été très utiles pour notre travail; ils nous ont permis entre autres de repérer les personnes ressources susceptibles de nous fournir des informations pertinentes et de fournir une partie de l'information nécessaire pour faire les recommandations présentées dans le présent document.

Les principales personnes consultées incluent:

Richard Bull, U.S. E.P.A. Cincinatti, Ohio

Frederick C. Kopfler, U.S. E.P.A. Cincinatti, Ohio.

Robert A. Neals, University Vanderbilt, Nashville, Tenessee

Joseph Cotruvo, U.S. EPA, Washington, D.C.

Elaine Stanley, U.S. EPA, Superfund Office,Washington, D.C.

Guy LeBel, Santé et Bien-être, Canada

Peter Toft, Santé et Bien-être, Canada

De notre correspondance et des conversations téléphoniques avec ces chercheurs, nous concluons qu'il existe aux États-Unis des cas de contaminations aussi importants que celui de la ville de Mercier mais nous n'avons pu obtenir de détail concernant ces sites car les décisions n'étaient pas encore rendues. Plusieurs des personnes interviewées, dont principalement F.C. Kopfler, ont suggéré de se baser pour le cas de la ville de Mercier, sur les critères établis par le "National Research Council" des États-Unis pour le compte de "Environmental Protection Agency" des États-Unis relativement à l'utilisation de l'eau de conservation recyclée. Ces interviews nous ont aussi permis de retracer les personnes ressources les plus susceptibles d'aider le ministère de l'Environnement du Québec à trouver une solution au problème de la ville de Mercier en se basant sur des décisions déjà prises dans des situations similaires.

La principale personne qui, à mon avis, est disposée à aider les fonctionnaires québécois à résoudre ce problème est monsieur Cotruvo, directeur du Département "E.P.A. drinking water standard". Il est celui qui prend les décisions dans les cas de contamination d'eau de consommation implicant un nombre restreint de polluants. Il prend aussi les décisions sur la nature du traitement nécessaire et les moyens d'évaluer l'acceptabilité de l'eau traitée.

Il a bien voulu me faire part de son approche vis-à-vis des cas de contamination d'eau potable. Bref, il voit deux façons de solutionner le problème. La première dite du "Best available technology" et la seconde dite du "Risk calculation model".

La première consiste à utiliser la technologie de pointe pour détecter et quantifier les micropolluants présents afin de s'assurer que leur concentration respective est en dessous du seuil critique établi par les normes

gouvernementales. S'il n'existe pas de normes pour un produit en particulier, il est alors suggéré d'effectuer les tests de toxicité nécessaires pour établir les concentrations acceptables.

La seconde approche "Modèle de risque calculé" qui se base sur des tests de toxicité n'a pas la faveur de monsieur Cotruvo bien que celui-ci ait insisté sur le fait que l'approche retenue pour résoudre un problème de contamination relève plutôt d'une décision politique que scientifique. Monsieur Cotruvo ne favorise donc pas l'étude de la toxicité pour déterminer les risques calculés et ce pour deux raisons. D'abord, selon lui, le choix du modèle de risque retenu (car il en existe plusieurs) est basé sur une décision politique et en deuxième lieu, il admet qu'une réponse positive (mise en évidence de toxique dans le test choisi) pourrait impliquer plusieurs années de recherches avant de redonner à l'eau une qualité acceptable pour la consommation humaine.

Il faut cependant rappeler que certains autres intervenants, tels que le F. Kopfler du U.S.E.P.A., favorisent plutôt les modèles de risques pour faire l'évaluation d'une eau de consommation polluée. Mme Elaine Stanley du U.S.E.P.A. Superfund Office est la seconde personne qu'il est important de consulter pour obtenir des informations sur l'existence de cas semblables à celui de la ville de Mercier. Mme Stanley et M. Cotruvo m'ont affirmé verbalement qu'il existe aux États-Unis des cas semblables à ceux de la ville de Mercier. Cependant aucun de ces cas n'est encore solutionné.

2.2 MODÈLES D'EAUX POTABLES CONTAMINÉES QUI SONT CITÉES DANS LA LITTÉRATURE

Notre objectif initial qui était de répertorier des cas semblables à ceux de la ville de Mercier pour connaître les décisions prises quant au type de traitement et aux normes d'acceptabilité retenus n'a pas été atteint (voir section 2.1).

Bien que des cas de contamination d'eau potable existent certainement, il est difficile d'obtenir les informations concernant les décisions politiques prises à ce chapitre. De plus, à cause de la singularité de chacun des cas en particulier, il n'est pas possible de transférer à un autre cas les décisions prises dans une situation donnée.

Le modèle que nous suggérons et qui a aussi été suggéré par certains des intervenants mentionnés dans la section précédente est celui des eaux de consommation recyclées (reused drinking water). Dans ce cas, comme pour celui de la ville de Mercier, les eaux à traiter sont contaminées par une grande variété de substances chimiques; seuls quelques points diffèrent. Les eaux de la ville de Mercier ont déjà subi des analyses chimiques révélant du moins en partie la composition des polluants présents. Au contraire, la composition de la matière organique présente dans les eaux recyclées peut varier considérablement en fonction du temps et n'est pas toujours constituée de polluants toxiques et récalcitrants.

L'avantage d'utiliser le modèle des eaux recyclées pour orienter les choix à faire dans le cas de la ville de Mercier est que ce modèle a fait l'objet de nombreuses études gouvernementales américaines desquelles ont été suggérés des critères d'acceptabilités des eaux recyclées. Ces critères sont d'ordre très général et applicables dans un grand nombre de situations.

2.3 EXEMPLES CONNUS D'EAUX RECYCLÉES

Il existe très peu d'exemples d'eaux recyclées. L'usine de Windhoek en Afrique du Sud est parmi les rares usines de recyclage d'eau dans le monde qui sert à approvisionner en eau un bassin de population (Grabow et al 1985). Cependant, les décisions politiques prises dans ce cas particulier sont difficilement applicables au cas de la ville de Mercier puisque les critères d'acceptabilité des eaux entre notre pays et l'Afrique du Sud diffèrent considérablement et qu'en Afrique du Sud, contrairement au Québec, les sources d'approvisionnement en eau sont très rares.

L'autre exemple connu est celui de Montebello Forebay dans la région de Los Angeles. Depuis 1962, après un traitement primaire et secondaire des eaux usées, celles-ci sont diluées avec des eaux d'autres sources et elles sont réinjectées dans la nappe souterraine qui sert à alimenter la population. Dans ce cas précis, des études de Nellor et al (1984a et b), et de Baird et al, (1984) ont démontré par le test d'Ames, la présence d'une activité mutagène dans les eaux de la nappe. Cette activité n'était cependant pas reliée, apparemment, à un constituant en particulier, mais plutôt à l'effet additif de plusieurs micropolluants présents. Aucune étude n'a cependant encore été réalisée pour vérifier la toxicité de cette eau envers les animaux. Toutefois, une étude épidémiologique (Frerichs et al 1982) semble relier la consommation de cette eau à une incidence significativement plus élevée du cancer du rectum chez la population. Cette dernière observation reste à confirmer dans une étude en cours (Frerichs et al 1982) mais elle présente certainement un sérieux avertissement qu'avant de distribuer pour consommation humaine des eaux présentant des risques, il est nécessaire de s'assurer qu'elles soient acceptables.

Chapitre 3

MÉTHODES D'ANALYSE DE LA TOXICITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES

3.0 Résumé

Dans ce chapitre nous décrivons les différents systèmes biologiques disponibles pour évaluer et possiblement extrapoler la toxicité de produits de consommation humaine et nous décrivons ensuite, brièvement, des exemples d'application de ces tests dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire et pour l'analyse d'échantillons d'eau de consommation.

Les systèmes biologiques décrits dans ce chapitre incluent d'abord les animaux qui restent à ce jour le seul système qui nous permette d'extrapoler à l'homme les essais de toxicité d'échantillons de toutes natures mais destinés à la consommation humaine. Nous décrivons ensuite les autres essais biologiques qui nous permettent d'obtenir une indication préliminaire de la toxicité d'un échantillon. Ces tests rapides et beaucoup moins coûteux que les tests chez les animaux sont largement utilisés, particulièrement en industrie pharmaceutique, pour obtenir une information préliminaire sur la qualité d'un produit et éviter ainsi des coûts inutiles de l'analyse de toxicité chez les animaux.

3.1 DESCRIPTION DES DIFFÉRENTS SYSTÈMES BIOLOGIQUES POUVANT SERVIR À ÉVALUER LA TOXICITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES

Dans cette section, nous décrivons les essais de toxicité chez les animaux et les essais de toxicité rapides *in vitro*. Nous décrivons les organismes à utiliser, la procédure générale de chacun des tests, leur coût et leur valeur prédictive ou la façon d'extrapoler les résultats à l'homme.

3.1.1 Essais chez les animaux

Cette section décrit en détail la procédure pour évaluer la toxicité d'un agent à action biologique en utilisant le système animal. Nous mentionnons les animaux généralement utilisés, le protocole d'analyse incluant les tests de toxicité aigüe, sub-aigüe et chronique et enfin nous présentons les méthodes d'extrapolation à l'homme des résultats.

3.1.1.1 Animaux généralement utilisés.

La sélection et l'entretien des animaux de laboratoire qu'on utilise dans les épreuves de toxicité conditionne dans une large mesure la réussite de l'expérience, l'extrapolation des données à l'homme et le coût des programmes d'évaluation. Afin d'obtenir des résultats à partir d'un nombre suffisant pour fournir des analyses statistiques valables, on utilise généralement de petits rongeurs. On utilise aussi parfois des chiens. Les procédures recommandées par les organismes consultatifs (entre autres, aux États-Unis, mais pas en Angleterre) imposent souvent au moins une espèce de non-rongeur.

Pour la sélection des animaux destinés à la recherche toxicologique, l'Organisation mondiale pour la santé (OMS, 1979) recommande de prendre en considération les facteurs fondamentaux suivants: sensibilité, commodité, similitude avec le métabolisme humain. Sauf indication contraire on recommande généralement (OMS, 1979) d'extrapoler à l'homme, les résultats obtenus des espèces les plus sensibles.

Théoriquement, selon Rall (1974), cinq facteurs peuvent être responsables des variations de la sensibilité des espèces aux différents produits chimiques. Ces facteurs sont l'adsorption, la distribution dans l'organisme, le storage, le métabolisme et l'excrétion. Nous verrons plus loin que la prise en considération de ces facteurs est importante pour l'évaluation des facteurs de risques chez l'humain à partir des données chez les animaux.

3.1.1.2 Protocole général pour le test de toxicité animal utilisé en industrie pharmaceutique et alimentaire

Le protocole général pour le test de toxicité animal inclut trois phases qui sont décrites dans les sous-sections de ce chapitre. Ces phases incluent d'abord un test de toxicité aigüe chez un animal sain suivi d'analyses de toxicité subaigüe et chronique. Les analyses de toxicité subaigüe et chronique sont essentielles pour s'assurer de la qualité d'un produit pour consommation humaine. Le test de toxicité aigüe permet de guider les concentrations de produit à administrer aux animaux au cours des analyses subaigües et chroniques.

3.1.1.2.1 Généralités

L'objectif primordial de l'expérimentation toxicologique est de déterminer les effets provoqués par les produits chimiques sur les systèmes biologiques et de recueillir des données sur les caractéristiques doses-réponses de ces substances. Ces données sont susceptibles de fournir une information sur le degré de risque pour l'homme et l'environnement, résultant d'une exposition éventuelle à ces produits.

Il existe plusieurs méthodes d'épreuves toxicologiques. Toutefois elles comportent toutes des études de toxicité aiguë, subaiguë et chronique. Toutes les méthodes ont aussi en commun d'exiger que des groupes d'animaux en bonne santé, hébergés dans des conditions convenables soient exposés à des doses connues des produits testés. On utilise couramment des rats, des souris, des cobayes, des hamsters, des chiens, des porcs et des primates. En général, il existe un groupe témoin auquel on administre l'excipient ou un simulacre de traitement. On observe ensuite soigneusement les animaux pour déceler des signes d'intoxication. À la fin de l'expérimentation, tous les animaux, y compris ceux du groupe témoin, subissent un examen anatomo-pathologique.

Les animaux doivent être en bonne santé, génétiquement stables et d'origine convenablement identifiée. Animaux traités et témoins devraient appartenir au même groupe (e.i. provenir de la même lignée, avoir le même âge, se situer dans les mêmes limites de poids, etc.).

Avant le début de l'expérimentation, ont doit faire subir aux animaux une quarantaine dans des conditions convenables identiques à celles de l'expérimentation. Les normes définissant les conditions convenables ont été publiées par le Conseil canadien sur les soins des animaux (1980).

Les régimes alimentaires doivent couvrir tous les besoins nutritionnels et la nourriture ne doit pas être contaminée par des impuretés susceptibles d'influencer les résultats. Un vétérinaire qualifié en médecine des animaux de laboratoire devrait procéder à un examen clinique hebdomadaire (Santé et Bien-être Canada, 1973).

3.1.1.2.2 Test de toxicité aiguë

On définit la toxicité aiguë comme étant l'ensemble des effets nocifs survenant très peu de temps après l'administration soit d'une dose unique, soit de doses multiples d'un produit, réparties sur 24 heures (Hogan, 1959).

La méthodologie la plus utilisée pour évaluer la toxicité aiguë d'un nouveau produit implique la détermination de la dose léthale médiane (DL50) du composé. La DL50 est définie comme "l'expression statistique de la dose du produit qui est supposée tuer 50 pour cent des animaux (Armitage et Allen, 1950). Le protocole pour la détermination de la DL50 consiste à traiter un groupe d'animaux avec une série de doses liées par une relation mathématique en vue de déterminer celle qui tue 50 pour cent du groupe et de tracer la courbe dose-réponse. Les méthodes les plus courantes pour le calcul de la DL50 sont celles de Litchfield et Wilcoxon (1947) celle de Thompson (1947) et celle de Weil (1952).

Les tests de toxicité aiguë réalisés sur de nouveaux produits servent surtout à connaitre la distribution et le métabolisme des produits chimiques ainsi que le niveau des doses à administrer au cours de l'épreuve de toxicité subaiguë et chronique. Quant à la valeur de la DL50 qui est utile pour évaluer la toxicité d'un nouveau produit, elle ne trouve pas d'utilité pour l'extrapolation des résultats chez l'homme. On parle alors

plutôt de seuil de tolérance ou dose journalière admissible comme on le verra plus loin. Pour cette raison, nous jugeons qu'il est inutile de s'attarder d'avantage au moyen de calcul de la DL50.

La toxicité aiguë peut varier considérablement avec l'âge et pour cette raison (Yearly et Benish, 1965) suggèrent l'emploi d'animaux de groupe d'âges différents.

Pour chaque groupe de doses, on utilise généralement de huit à dix rongeurs (le nombre variant selon la méthode choisie pour le calcul de la DL50). Au moins quatre doses en progression géométrique devraient être testées. Quant au mode d'administration, il se fait généralement selon celui par lequel l'homme sera exposé (OMS, 1979). À la fin de l'expérience, un anatomo-pathologiste qualifié devrait procéder à l'autopsie de tous les animaux.

3.1.1.2.3 Toxicité subaiguë

L'épreuve de toxicité subaiguë implique en général une exposition quotidienne, pendant une période atteignant jusqu'à 90 jours. Elle fournit des renseignements sur les effets toxiques principaux des produits et sur les organes cibles affectés (OMS, 1979). Les résultats de cette étude permettent aussi de concevoir les épreuves de toxicité chronique. En effet, si les études de toxicité subaiguë ont prouvé la toxicité de ce produit et si on a une information toxicologique et métabolique suffisante, on dispose alors d'une base pour sélectionner l'espèce cible de choix pour effectuer les tests de toxicité chronique. Pour les composés qu'on est sur le point de lancer sur le marché, on pourra suivre, pour le choix de l'espèce, les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1979) ou celles de Santé et Bien-être Canada (Leclair et Willard, 1970).

La recommandation minimale, selon l'OMS, (1979), pour les études de toxicité subaiguë exige l'utilisation de deux espèces animales dont une de rongeur. Il est de tradition d'utiliser le rat et le chien bien que l'usage du chien soit parfois controversé (Calabrese, 1978).

Avec le rat, les épreuves doivent commencer aussitôt après le sevrage et être conduites avec au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe de dose et l'expérimentation doit se poursuivre pendant 10 pour cent de la durée de vie de l'animal (c.a.d. 3 mois). Il est recommandé de faire des observations toutes les trois semaines pendant la période d'exposition. On note alors l'apparence clinique de l'animal (fourrure, yeux, comportement général), son poids et sa capacité de reproduction (incluant les effets tératogènes. Enfin, il est nécessaire de pratiquer une autopsie sur tous les animaux.

3.1.1.2.4 Test de toxicité chronique

L'objectif essentiel de l'étude de toxicité chronique est de déterminer la nature et la gravité des effets toxiques et la dose de "non-observation d'effets indésirables". Les résultats obtenus peuvent servir à établir les niveaux d'exposition acceptables pour l'homme. Parmi les effets de toxicité chronique, l'oncogénicité (cancérogénicité) du produit est de fait la plus recherchée. Comme nous l'avons déjà mentionné ci-haut, il n'existe pas de corrélation entre toxicité aiguë ou subaiguë et effet cancérogène d'un produit. Il faut cependant connaître ces deux niveaux de toxicité d'un produit pour éviter la mort prématurée de l'animal cible au cours de l'expérimentation visant à évaluer la toxicité chronique d'un produit.

La toxicité chronique en Amérique, est généralement établie chez le rat et le chien exposés au produit pour une durée de deux ans (correspondant à la durée de vie du rat et 20 pour cent de la durée de vie du chien). En Angleterre l'étude porte plutôt chez le rat et la souris (Calabrese, 1978). L'OMS (1979) suggère de préférence des rongeurs pour les études de toxicité à long terme à cause de leur aptitude à faire des tumeurs; leur longévité relativement brève; leurs frais d'entretien réduits; la disponibilité de lignées consanguines et la grande quantité d'information disponible sur leur physiologie et leur pathologie. La souris, le rat et le hamster représentent les espèces de choix proposées par l'OMS (1958).

Il est essentiel que chaque groupe d'animaux compte le même nombre d'individus de chaque sexe et un nombre assez élevé d'animaux pour permettre l'évaluation statistique des résultats. On conseille généralement de ne jamais travailler avec moins de 25 animaux de chaque sexe.

La substance à tester doit être administrée à plusieurs niveaux de dose. Quant à la voie d'administration, comme pour les essais de toxicité aiguë et subaiguë, il est recommandé d'utiliser la voie à laquelle l'homme sera soumis.

Souvent, on commence les essais sur des jeunes adultes agés de sept à neuf semaines mais il est courant et recommandé (OMS, 1979) de commencer le traitement tout de suite après le sevrage.

L'objectif des recherches sur la cancérogénicité est d'obtenir l'effet cancérogène maximum possible. Pour ce faire, on travaille à des niveaux élevés d'exposition. En général, on utilise un niveau de dose

qui soit le plus élevé, compatible avec une longue survie de la majorité des sujets exposés. L'expérimentation doit évidemment comporter un groupe témoin, non traité, de taille identique ou supérieure au groupe d'animaux traités.

Enfin, lorsqu'on décrit les tumeurs, il est important de préciser exactement les critères utilisés pour classer les lésions hyperplasiques, prénéoplasiques ou néoplasiques, bénignes ou malignes.

3.1.1.3 Méthodes d'extrapolation de la toxicité chez l'homme

L'extrapolation des résultats des tests de toxicité de l'animal à l'homme est une étape essentielle pour s'assurer de l'acceptabilité d'un agent chimique pour fin de consommation humaine. Cette extrapolation peut être effectuée selon au moins deux approches. La première approche implique une détermination de la dose maximale non toxique chez un animal sensible et l'application d'un facteur de risque pour transposer la valeur à l'homme. Le facteur de risque a généralement une valeur empirique comprise entre 100 et 5000. Pour toutes les nouvelles substances chimiques introduites commercialement et dont on connait le mécanisme d'action, on applique traditionnellement un facteur de 100 à la dose la plus élevée qui ne produit pas l'effet adverse chez les animaux.

La seconde approche, utile pour les cancérogènes qui agissent à faible dose, consiste à extrapoler les doses toxiques minimales à partir de la courbe dose-réponse chez l'animal cible et de l'exprimer en terme d'unité de dose par unité de surface corporelle pour transposer cette valeur à l'homme à l'aide d'une formule mathématique établie. Il existe plusieurs modèles mathématiques pour extrapoler à partir de faibles doses et les

résultats peuvent varier considérablement selon l'approche utilisée. À la section 3.1.1.3.3 nous décrirons à titre d'exemple la méthode de Mantel et Bryan, reconnue par l'OMS, et la méthode de Crumps. Ce dernier modèle est adopté par plusieurs agences gouvernementales américaines et fait appel à un programme informatisé, le programme Global 79 qui permet d'extrapoler à partir des résultats obtenus à faible dose, les doses minimales requises pour causer un cancer chez l'animal cible. Puisqu'il semble établi qu'exprimée en terme de dose par unité de surface corporelle, l'extrapolation des résultats d'un animal à l'autre et à l'homme correspond très bien, ce modèle prévoit ensuite l'utilisation d'une formule mathématique pour convertir les résultats d'unité de dose par unité de poids corporel en unité de dose par unité de surface corporelle.

3.1.1.3.1 Généralités

Utilisant l'animal pour prédire la toxicité des produits chimiques chez l'homme, il faut rendre compte d'abord d'un certain nombre de critères susceptibles d'influencer les résultats.

La première est la taille de l'animal. En général, le métabolisme est plus lent chez les gros animaux. Ensuite, viennent les différences du taux d'absorption, de distribution, d'excrétion et du métabolisme d'un produit donné entre les différentes espèces animales et l'homme. Enfin, il ne faut pas négliger d'autres facteurs reliés à l'expérimentation comme le faible nombre d'animaux testés en comparaison de l'ensemble des hommes qui seraient exposés à un agent et l'hétérogénicité des hommes exposés à

l'agent (différence d'environnement, de nutrition, de physiologie, d'état de santé, etc.) par rapport à l'homogénéité de l'animal ayant servi à déterminer l'extrapolation.

De façon générale l'extrapolation à l'homme des résultats de toxicité chez les animaux peut être effectuée selon deux méthodes distinctes. La première implique une détermination de la dose maximale non toxique chez un animal sensible et l'application d'un facteur de risque pour transposer la valeur à l'homme. La seconde méthode, utile pour les cancérogènes, consiste à extrapoler les doses toxiques minimales à partir de la courbe dose-réponse chez l'animal cible et de l'exprimer en terme d'unité de dose par unité de surface corporelle pour transposer cette valeur à l'homme à l'aide d'une formule mathématique établie.

Le choix de la méthode retenue est une décision empirique car il n'existe pas d'étude démontrant la supériorité d'une méthode sur l'autre. Cependant, pour la détermination des doses journalières acceptables, dans le cas de cancérogènes, la méthode d'extrapolation de faible dose sur la courbe dose-réponse est la plus utilisée.

Les deux prochaines sections décrivent plus en détail chacune de ces méthodes.

3.1.1.3.2 Seuil de tolérance et facteur de risque

Les courbes dose-réponse peuvent présenter une grande variété de forme. Dans certaines gammes de doses elles peuvent être linéaires, mais le plus souvent, elle ne le sont pas (OMS, 1979) (voir Annexe 1 pour la description mathématique des courbes dose-réponse). Les courbes dose-réponse illustrent la relation entre la dose et la proportion d'individus qui réagissent par un effet (e.i. mort-vie, tumeur - pas de tumeur, etc.).

Souvent la courbe présente une forme en S qui s'explique par l'existence d'un seuil de tolérance des individus de la population à un agent chimique déterminé. Au-dessous d'une certaine dose ou limite d'exposition, c'est-à-dire, au-dessous d'un seuil, une substance chimique peut ne pas provoquer d'effet toxique.

La valeur de la dose journalière admissible (DJA) d'un certain produit pour l'homme ne peut cependant pas être tirée directement de la courbe dose-réponse obtenue chez les animaux. De façon générale, on considère un facteur de risque ou de sécurité.

Comme nous l'avons déjà souligné, la différence de taille entre les différentes espèces animales est un facteur important qui affecte plusieurs paramètres physiologiques pouvant interférer avec la procédure d'extrapolation. Le métabolisme des petits animaux est plus rapide, leur rapport surface/volume est plus élevé que pour les plus gros animaux.

D'autres facteurs importants sont aussi à considérer pour l'extrapolation à l'homme des études de toxicité. Un premier facteur est la nature du produit chimique. Citons à ce chapitre l'exemple de l'aflatoxine qui est plus toxique pour le rat que pour la souris car chez cette dernière, l'aflatoxine est plus rapidement métabolisée et atteint plus lentement les cellules hépatiques. (Portman et al., 1970).

Les autres facteurs susceptibles d'affecter l'extrapolation à l'homme des doses toxiques incluent le synergisme des agents toxiques entre eux, la différence de la longévité de l'homme par rapport à celle des animaux.

Quant à la valeur du facteur de risque elle est généralement fixée arbitrairement entre 1 et 5000. Très fréquemment, on utilise la valeur de 100 (OMS, 1979). Pour toutes les nouvelles substances chimiques

introduites commercialement, traditionnellement, on applique un facteur de 100 à la dose la plus élevée qui ne produit pas d'effets adverses chez les animaux pour déterminer la DJA humaine.

En donnant des valeurs variables entre 1 à 100 à chacun des facteurs suivants: taille, quantité de nourriture requise, balance d'eau, fonction hormonale, différence inhérente des espèces dans la susceptibilité des produits toxiques, Bigwood (1973) a tenté de donner une interprétation logique au facteur de sécurité de 100. Toutefois, à ce jour, aucune donnée scientifique au-delà de la spéculation n'appuie la théorie de Bigwood (1973).

L'estimation des risques chez l'homme en extrapolant les valeurs de toxicité obtenues chez les animaux est donc sujette à des variations considérables selon le facteur de risque utilisé pour faire le calcul de risque. De plus, il n'existe malheureusement pas d'approche normalisée (standard) pour évaluer les risques encourus par une exposition à un produit. (U.S. Fed Register, 1984).

À ce chapitre, il faut comparer les situations entre elles et se baser sur les données les plus récentes nous permettant de juger le plus adéquatement de la façon d'extrapoler.

3.1.1.3.3 Extrapolation des faibles doses et expression en terme de dose par unité de surface corporelle.

Pour la majorité des agents causant une toxicité aiguë, la courbe dose-réponse présente une forme sigmoïdale reflétant l'existence d'un seuil de tolérance. À ce chapitre, il est donc possible d'extrapoler, en appliquant un facteur de sécurité à la dose maximale ne produisant pas

d'effet toxique chez l'animal le plus sensible à l'agent. Pour les cancérogènes, il en va cependant autrement, et ce, pour deux raisons.

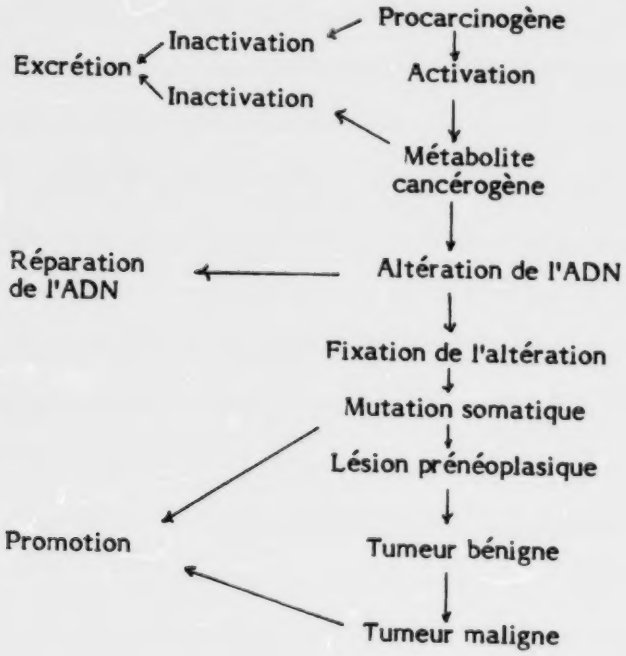
La première est que de façon générale, les analyses de toxicité effectuées chez les animaux sont réalisées à de très fortes doses des produits à tester comparativement aux doses auxquelles l'homme sera exposé. La raison de ce choix est que pour obtenir des données statistiques valables, un trop grand nombre d'animaux serait requis pour réaliser une expérimentation utilisant de faibles doses.

La deuxième difficulté rencontrée en extrapolant les cancérogènes, est l'absence d'un seuil de tolérance. En effet, plusieurs auteurs admettent que comme pour les radiations ionisantes, il suffit d'une seule molécule d'un cancérogène (ou mutagène) pour déclencher le processus susceptible de mener à un cancer en altérant la structure de la molécule d'ADN.

Il s'ensuit que pour les cancérogènes, il est admissible que la courbe dose-réponse ne présente pas de seuil (OMS, 1979). Notons toutefois que pour certains auteurs, les autres mécanismes impliqués dans la formation d'un cancer (conversion des cellules pré-néoplasiques en tumeur par exemple) (voir figure III-1) peuvent affecter la courbe dose-réponse pour lui infliger une allure sigmoïdale.

Fig. III-1

ÉTAPES BIOLOGIQUES DU DÉVELOPPEMENT DE NÉOPLASMES



Tiré de Bull (1982)

L'extrapolation des doses faibles est basée sur les modèles mathématiques conçus pour prévoir la réponse à une dose faible donnée. À ce jour, il faut souligner qu'aucun de ces modèles ne peut être considéré précis puisque tous se basent sur des théories différentes quant au mécanisme de formation du cancer.

Par exemple, si on assume qu'à l'instar des radiations ionisantes il n'existe pas de seuil d'activité pour les cancérogènes (mutagènes), il s'ensuit que la courbe dose-réponse sera une droite et l'extrapolation des doses faibles sera basée sur ce type de courbe. Par contre, s'il est admis que certains cancérogènes présentent un seuil d'activité, il sera nécessaire de développer une formule mathématique pour extrapoler la dose seuil. Dans ce dernier cas, la méthode la plus simple fait appel au modèle probit (voir Annexe 1 pour la définition de probits). De plus les modèles peuvent varier selon que l'on considère ou non la présence d'un niveau d'exposition naturel ou la possibilité de formations spontanées de cancer.

L'extrapolation de faibles doses est un problème très difficile qu'on ne peut résoudre par les seules méthodes statistiques (OSM, 1979). Lorsqu'on utilise les méthodes existantes on doit toujours garder à l'esprit leur limitation intrinsèque (EPA. 1980). Nous examinerons ici deux modèles d'extrapolation basés, chacun sur une approche de calcul différente.

Modèle 1

Modèle de Mantel et Bryan (1961)

Ce modèle qui fut modifié récemment (Mantel et al. 1975) est un modèle purement mathématique qui a le désavantage de ne pas rendre compte de nos connaissances biologiques actuelles sur le développement des cellules cancéreuses et qui n'a pas la faveur des instances décisionnelles américaines (EPA, 1980). Toutefois ce modèle est reconnu par l'OMS (OMS, 1979).

Le modèle de Mantel et Bryan avec probits donne une courbe dose-réponse présentant une concavité aux faibles niveaux de doses. Le modèle implique: 1) le choix de la limite désirée de réponse (p. exemple 1 sur 100 000 000); 2) l'estimation de la limite supérieure de confiance (LSC) à 99 pour cent pour la réponse observée à la dose "Q" et 3) l'obligation d'une droite de probits de la dose (pour définition de probits - voir Annexe 1) - log de pente (B) égale à 1 (c'est-à-dire 1 probit pour un intervalle de dose décuplé.

La limite supérieure de risque avec une limite de confiance de 99 pour cent peut être calculée selon la formule mathématique suivante:

$$\sum_{i=r+1} {}_nC_i P^i (1-P)^{n-1} = 0.99$$

où

P = limite supérieure de risque

n = nombre d'animaux testés

r = nombre d'animaux avec tumeur

C_i = concentration du produit

Cette équation peut être résolue en se référant aux tables de probabilité binomiales cumulatives.

À titre d'exemple, lorsque n = 100 souris et r = 10 tumeurs, P = 0,192. La valeur correspondant à une probabilité de 19,2 pour cent en transformant la valeur en terme de log - dose (se référant à la courbe des probits) est de 4,741 pour avoir un risque limite de 1/100 million. La dose "sécuritaire" serait donc selon cette approche de 1/55 000 de la dose ayant servi à l'expérience chez les animaux. (55 000 étant l'antilog de 4,741).

Méthode 2

Modèle de Crumps modifié

Cette seconde méthode se base sur les connaissances actuelles des mécanismes de formation du cancer et elle est valable pour les agents agissant au niveau de l'ADN (cancérogène-mutagène) car elle assume l'existence d'une cible unique d'action et de plusieurs stages de développement de la cellule cancéreuse (pour les stages de développement du cancer, voir fig. III-1)

Le modèle de Crumps et al. (1976) avec certaines modifications a été adopté par plusieurs agences gouvernementales américaines (Anderson et al. 1983).

L'équation générale du modèle (équation 1) a la forme suivante:

eq. 1) $$P(d) = 1 - \exp - (q_0 + q_1 d - q_2 d^2 + \ldots + q_k d^k)$$

où P(d) représente le risque (probabilité) de développer un cancer pendant la vie de l'animal à une dose (d).

q_i 0 représente les nombreuses variables du système menant au cancer.

et i = 0 à k.

De même

eq. 2) $$A(d) = 1 - \exp -(q_1 d + q_2 d^2 + \ldots + q_k d^k)$$

où A (d) est la probabilité de développer un cancer au-delà du niveau de risque naturel (du bruit de fond)

ainsi

eq. 3) $$A(d) = \frac{P(d) - P(0)}{1 - P(0)}$$

Pour une limite supérieure de confiance de 95 pour cent, l'équation 2 peut être résolue par un programme informatisé préparé par Crumps et Watson, le programme s'intitule GLOBAL79 (Anderson et al., 1983).

À faible dose, la probabilité de développer un cancer au-delà du niveau naturel,

eq. 4) $A(d) = q^*_i \times d$

lorsque $q_i \neq 0$

Le terme (q^*_i x d) est pour une limite supérieure de confiance de 95 pour cent, la probabilité qu'un cancer se développe à une dose d'un agent pour laquelle le risque de développement de cancer est supérieur à la probabilité de développer un cancer sans exposition à l'agent. En calculant q^*_i on doit satisfaire l'équation 5,

eq. 5) $2 (L_o - L_i) = 2{,}70554$

où L_o = valeur maximale de la fonction Log - probabilité

L_i = re-maximalisation de la fonction Log - probabilité, lorsqu'on amène le paramètre q_i à la limite supérieure q^*_i.

La valeur de 2,70554 correspond à une limite de confiance de 90 pour cent pour un chi-caré à un degré de liberté de 1.

L'équation 4 représente une droite où la pente q^*_i est considérée comme étant le potentiel cancérogène le plus élevé qu'un produit chimique possède à basse dose.

En pratique, au moyen du programme GLOBAL79, on recherche les ensembles de données (doses et incidences de tumeur) pour lesquels le risque de développer un cancer pendant la vie est le plus élevé (q^*_i).

À partir de ces données, qui fournissent la dose minimale produisant un cancer chez l'animal, on peut extrapoler chez l'homme en utilisant l'équation 6 (Anderson et al., 1983) qui

fournit la dose totale d'exposition de l'animal (d) pendant sa vie en terme de mg/jour/surface corporelle.

eq. 6)

$$d = \frac{le \times M}{Le \times W^{2/3}}$$

le = durée de l'exposition

Le = durée de l'expérience

m = dose moyenne par jour (mg)

W = poids moyen de l'animal

La raison de la conversion des données de l'unité de dose par unité de poids en unité de dose par unité de surface corporelle, est qu'il a déjà été établi qu'en terme de dose par unité de surface corporelle en général, l'extrapolation des résultats d'un animal à l'autre et à l'homme correspond très bien.

En effet, les travaux de Freireich et al. (1966) et de Rall (1969) viennent appuyer fortement l'hypothèse que le rapport de la dose toxique animal/homme d'une substance exprimée en terme de dose par unité de surface corporelle est très près de 1. Et de là, la formule de conversion

$A = KW^{2/3}$

où A = surface corporelle

K = constante qui diffère selon l'espèce

K = 1 si l'on assume que les animaux ont une forme sphérique.

$W^{2/3}$ = poids corporel reporté en unité de surface

3.1.2 Essais rapide de toxicité in vitro

Les essais rapides de toxicité in vitro comprennent des tests de cytotoxicité qui sont destinés à évaluer l'effet d'un agent sur la biologie d'un organisme vivant et les tests de génotoxicité qui servent à évaluer l'effet d'un agent chimique sur le chromosome. Ce dernier test est d'importance primordiale pour repérer les agents cancérogènes puisque la plupart de ceux-ci sont des génotoxiques.

3.1.2.1 Cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité in vitro sont très utilisés pour évaluer la qualité toxicologique des eaux d'un point de vue écologique. Ils trouvent leur place dans une approche intégrée pour évaluer l'écotoxicité d'effluents. Toutefois, pour les eaux de consommation humaine (Van Coillie et al, 1984), les tests de cytotoxicité in vitro correspondent aux tests de toxicité aiguë et subaiguë chez les animaux. Puisque ces derniers tests peuvent être réalisés rapidement à un coût peu élevé, il est bien entendu préférable d'extrapoler la toxicité pour l'homme à partir de résultats obtenus chez les animaux qu'à partir des résultats de cytotoxicité in vitro. Dans cette section, nous décrirons quand même trois tests différents.

3.1.2.1.1. Bioessai avec bactéries - test microtox

Ce test de toxicité aiguë est basé sur les propriétés bioluminescentes de la bactérie Photobacterium phosphoteum (Blaise, 1984, Bulich, 1979). Ces dernières sont liées aux divers processus métaboliques de la cellule et l'intensité lumineuse dégagée par celle-ci est fonction de sa vitalité. La bioluminescence sera donc atténuée par les agressions toxiques.

Les bactéries sont exposées à différentes concentrations de l'échantillon et la bioluminescence est mesurée par photométrie à l'aide de l'appareil mis au point pour ce test.

Ce test fournit une mesure relative de la toxicité subléthale aiguë au niveau bactérien. L'extrapolation chez l'homme n'est cependant pas établie.

3.1.2.1.2 Bioessai avec algues

Ce test utilise l'algue verte unicellulaire Selenastrum capricarnutum (Greene et al., 1975). On évalue la concentration de l'échantillon testé qui inhibe 50 pour cent de la croissance de l'algue. Les paramètres mesurés peuvent être soit la biomasse, la concentration cellulaire ou l'ATP. Les mesures prises sur la population d'algues exposée à l'échantillon sont comparées à des valeurs théoriques qui ont été évaluées en fonction des facteurs de croissance contenus dans le milieu de culture.

Les algues sont mises en culture dans des milieux contenant différentes concentrations de l'échantillon. Le temps d'incubation varie de quelques heures à quelques jours selon le type de toxicité que l'on cherche à mettre en évidence, toxicité aiguë ou toxicité subaiguë. On procède par la suite aux mesures du paramètre retenu et à l'évaluation du pourcentage d'inhibition.

3.1.2.1.3 Bioessai avec cellules de mammifères

Des cultures cellulaires sont exposées à différentes concentrations de l'échantillon testé. On évalue la dose efficace 50 pour cent c'est-à-dire la concentration qui inhibe 50 pour cent de la croissance cellulaire. Des tests semblables avec des cellules de la lignée Hela et des

Fibroblastes de hamster ont servi à évaluer la toxicité des eaux traitées et non traitées d'usines françaises de traitement d'eau (Hémon et al, 1978).

3.1.2.2 Génotoxicité

Dans le cas des eaux de consommation recyclées (reused water), un Comité d'étude du "National Research Council" des États-Unis a réalisé une étude pour le compte de l'"Environmental Protection Agency" américain (NRC, 1982). Dans cette étude, le Comité considère "qu'il est impossible d'évaluer l'effet pour la santé des eaux recyclées, en se basant uniquement sur les concentrations des différents micropolluants détectés". En effet, le Comité d'experts considère que lorsqu'une trop grande quantité de différents produits sont présents simultanément dans des eaux polluées, la seule façon acceptable, à ce jour, pour prédire les effets chez l'homme est d'effectuer des tests de toxicité. Quant aux tests à employer, le Comité suggère une évaluation par gradation pyramidale. C'est-à-dire qu'il suggère d'évaluer d'abord la toxicité des eaux traitées au moyen de tests in vitro rapides (moins coûteux) pour détecter les mutagènes et d'obtenir une évaluation préliminaire de l'efficacité du traitement utilisé pour éliminer les micropolluants de l'eau brute. Les tests retenus ici sont les essais permettant de repérer les polluants mutagènes (cancérogènes) car la présence de ce groupe de composés ne peut être revélée chez les animaux qu'après de longues études coûteuses.

Une réponse négative (l'absence de mutagènes détectables par la méthode rapide) serait un indice sérieux de l'efficacité du traitement de l'eau et dans un deuxième temps, le Comité recommande de réaliser des tests de toxicité chez les animaux. Ces tests restent nécessaires pour s'assurer de l'acceptabilité d'une eau de consommation (EPA 1980).

Il importe donc à ce stade de décrire les tests in vitro rapides qui sont actuellement disponibles et de les évaluer d'un point de vue de coût et de leur crédibilité quant à la détection de cancérogènes humains.

3.1.2.2.1 Description sommaire des différentes méthodes rapides de détection in vitro de mutagènes.

Le tableau 3-1 énumère quelques exemples de chaque classe des tests rapides in vitro de détection de mutagènes qui sont décrits dans la littérature. Le tableau fait aussi part, sommairement, des avantages et inconvénients de chacun d'eux. Une évaluation du coût lorsque possible est aussi indiquée. Malheureusement, à ce jour, il est impossible d'évaluer la crédibilité (ou la valeur prédictive) de ces tests. Pour cette raison, le tableau n'en fait pas mention. À ce chapitre, nous renvoyons le lecteur à la section suivante (3.1.2.2.3) de ce chapitre, où nous présentons les données actuelles sur l'évaluation de ces tests. Afin de ne pas alourdir la présentation du présent rapport, nous référons le lecteur à l'annexe 2 pour une description de chacun des tests rapides de mutagénicité énumérés au tableau 3-1.

TABLEAU 3.1 - TESTS DE GÉNOTOXICITÉ

TESTS BASÉS SUR LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN

TEST	PRINCIPE DE BASE	AVANTAGES	DÉSAVANTAGES	COÛT MOYEN $Can/
Détection de la fragmentation en gradient de sucrose alcalin	mesure indirecte de l'intensité des mécanismes de réparation de l'ADN	.non spécifique (détecte tous les mutagènes)	.demande une expertise .appareillage complexe .valeur prédictive non connue	N.D.
Détection de la fragmentation par la vitesse de séparation des brins	mesure indirecte de l'intensité des mécanismes de réparation de l'ADN	.non spécifique	.expertise .appareillage complexe .résultats non reproductibles	N.D.
Détection de la fragmentation par la vitesse d'élution en milieu alcalin	mesure indirecte de l'intensité des mécanismes de réparation de l'ADN	.non spécifique . rapide .courbes effet-dose .utilisée de manière routinière dans l'industrie	.expertise .valeur prédictive mal connue	N.D.
Synthèse d'ADN déphasée (U.S.D.)	mesure le taux d'incorporation des bases pour la réparation de l'ADN	.résolution élevée .simple	.problèmes relatifs aux cultures de cellules .expertise	N.D.
Incorporation stimulée de (^{3}H) thymidine	mesure le taux d'incorporation des bases pour la réparation de l'ADN	.simple .non spécifique	.expertise .valeur prédictive mal connue	N.D.
Réplication de réparation mesurée à l'aide de gradients isopycniques	mesure le taux d'incorporation des bases pour la réparation de l'ADN	.non spécifique	.Expertise valeur prédictive mal connue	N.D.
Réplication de réparation mesurée par la photolyse du bromouracil	mesure le taux d'incorporation des bases pour la réparation de l'ADN	.non spécifique	.Expertise .valeur prédictive mal connue	N.D.
Test basé sur l'absence de système de réparation chez E. coli (Pol A$^-$)	mortalité plus élevée chez une souche Pol A$^-$ à la suite d'exposition	.très rapide et simple .non spécifique	.résultats faussement négatifs ou positifs	500 (sous-estimé)

Tableau 3.1 (suite)

TESTS DE MUTAGENICITÉ

Test	principe de base	avantages	désavantages	coûts moyen chargé
Test de Ames avec Salmonella typhimunum	croissance de mutants sur un milieu sélectif	.simple et rapide .résultats reproductibles .test éprouvé	.résultats faussement positifs ou négatifs	entre 800 ou 1500 $
Test avec E. coli WP-2	croissance de mutants sur un milieu sélectif	.simple et rapide .test éprouvé	.résultats faussement positifs ou négatifs	entre 500 à 1500 $
Test avec Sacharomyces cerevisiae	croissance de mutants sur milieu sélectif	.simple et rapide	.purification des cultures .peu sensible aux procarcinogènes	1 personne 1 aide occasionnelle
Host mediated avec Saccharomyces cerevisiae administré à l'hôte	croissance de mutants sur un milieu sélectif activation in vivo	.système d'activation In vivo	.expertise requise .purification des cultures .peu sensible aux procarcinogènes	2000 - 3000 $
Test d'induction	Induction du phage Lamda par des agents mutagènes	.très rapide	.spécificité .résultats faussement positifs ou négatifs .modèle peu utilisé	1000 - 1500 $
Test de fluctuation des bactéries	croissance de mutants prototrophes en milieu liquide	.plus sensible que test sur milieu solide .s'adapte bien aux échantillons aqueux	.spécificité .résultats faussement .positifs ou négatifs .pour matagènes stables	1000 - 1500 $
Test commercial Mutascreen	test de fluctuation rapide	.rapide et simple .s'adapte à de gros volumes .applicable aux salmonelles ou autres cellules	.test non éprouvé .possibilité d'artefact .appareil requis	1 personne + achat l'appareil
Mutation au locus tK avec cellules lymphoma L51178Y de souris	croissance de cellules mutants sur un milieu sélectif	.cellules de mammifère efficacité de clonage .temps de génération court	.facilement contaminable .problèmes relatifs aux cultures cellulaires	6000 - 10000 $
Mutation au locus HGPRT avec cellules V79 de Hamster chinois	croissance de mutants sur un milieu sélectif	.cellules de mammifères efficacité de clonage .taux de réversions spontanées faibles	.problèmes reliés aux cultures cellulaires	4300 - 9000 $
Mutation au locus HGPRT avec fibroblastes humains	croissance de mutants sur un milieu sélectif	.cellules humaines	.grande variabilité entre les souches .durée de vie très courte	5000 - 9000 $

Tableau 3.1 (suite)

TESTS CYTOGÉNÉTIQUES

Test	principe de base	avantages	désavantages	coût moyen chargé
Recombinaisons mitotiques avec Saccharomyces cerevisiae	croissance de recombinants	.simple et rapide	.peu sensibles aux procarcinogènes	(2000 $)
Test cytogénétique de leucocytes chez un hôte	aberrations chromosomiques chez des leucocytes exposés via un animal hôte	.cellules humaines .système d'activation in vivo	.encore au stade expérimental	N.D.
Test de micronoyau (M.T..)	présence de micronoyaux à la suite de l'induction de bris chromosomiques	.test in vivo .simple et rapide, quantité .importante d'échantillon	problèmes relatifs à la voie d'administration et au dosage	entre 2500 et 7800 $
Échange entre chromatides soeurs	Mesure par colorimétrie au microscope, du degré d'échange entre les chromatides soeurs	.rapide .largement utilisé	.la corrélation entre l'induction d'échanges de segments d'ADN et la cancérogénicité n'est pas établie	entre 15 000 et 17 000 $
Analyse en métaphase des cellules de la moelle osseuse	aberrations chromosomiques cehz les cellules de la moelle osseuse	.Test in vivo .rapide	.quantité d'échantillon limitée	entre 15 000 et 17 000 $
Translocations héréditaires chez les mammifères mâles	détection des aberrations chromosomiques chez les spermatocytes de la GI et F1	.cellules germinales	.test plus ou moins sensible	entre 10 000 et 20 000 $
TRANSFORMATION IN VITRO ET TESTS IN VIVO				
Transformation in vitro avec cellules embryonnaires de hamster	détections des colonies de cellules transformées	.détecte aussi les cancérogènes, non mutagènes	.demande une expertise, problèmes reliés aux cultures cellulaires	entre 3000 et 5000 $
Mutation léthale dominante chez la souris mâle	mortalité des embryons avant et après l'implantation	.cellules germinales .protocole standardisé	.coûteux plus ou moins sensible	entre 15 000 et 20 000 $
Test avec Drosophile SLRL et autres	détections des altérations chromosomiques à partir de l'absence complète de classes phenotypiques	.système d'activation in vivo, couvre toutes les catégories de dommages	.peu sensible aux hydrocarbures polycydique	entre 8000 et 15 000 $

Tableau 3-1 (suite)

TESTS RAPIDES DE CARCINOGÉNICITÉ IN VIVO

Production de foyers prénéoplasiques sur foie de rats	Examen histochimique de foie de rats exposés à un agent	.rapide .peu coûteux par rapport à l'exposition à vie .Détecte les agents promoteurs	Expertise stade expérimental	---
Initiation/promotion du cancer de la peau	Exposition d'une souche de source sensible aux cancérogènes Décompte des papillomes	.rapide .peu coûteux .Distinction entre initiation et promotion	Expertise stade expérimentale	---

3.1.2.2.2 Crédibilité des tests rapides in vitro de génétoxicité pour la détection de produits oncogènes.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il n'existe pas de données suffisantes, à ce jour, sur l'ensemble des tests de mutagènes in vitro nous permettant d'évaluer leur valeur prédictive pour la détection de cancérogènes humains. À ce jour, il n'existe donc pas de modèle mathématique éprouvé qui nous permette d'extrapoler à l'homme les résultats des tests de mutagénicité in vitro. À ce sujet, Ehrenberg (1979) a tenté de développer un modèle de calcul de risque basé sur l'hypothèse que les cancérogènes agissent selon un mécanisme identique aux radiations ionisantes. Cependant, ce modèle théorique, le seul que nous ayons retracé au cours de notre recherche bibliographique, n'a jamais à notre connaissance été vérifié.

Pour plus de 90 pour cent des 800 composés reconnus mutagènes à ce jour, l'activité mutagénique a été révélée par l'un ou l'autre des essais utilisant Salmonella thyphimurium ou Escherichia coli (Brusick, 1983). De plus, un groupe d'étude (Gene Tox) de l'"Environmental Protection Agency" des États-Unis a observé que la grande majorité des composés reconnus mutagènes par le test utilisant E. coli sont aussi positifs dans le test de Ames (Brusick et al, 1980). De plus, soulignons que Purchase (1982) qui distingue trois catégories de tests de mutagénécité in vitro: tests en développement; tests développés et tests établis, considère que seul le test de Ames (utilisant les salmonelles) mérite d'être considéré test établi.

Exception faite du test employant la drosophile, le test de Ames est le seul pour lequel nous possédons des informations adéquates sur les faiblesses et les particularités techniques du test. Ainsi, nous connaissons la spécificité du test vis-à-vis des différents groupes de composés

chimiques (Rinkus et Legator, 1979) et plusieurs études comparatives ont été réalisées dans divers laboratoires afin de déterminer la reproductibilité du test.

Plusieurs études visant à établir la corrélation entre les résultats du test de Ames et l'oncogénicité des substances testées chez les animaux ont été réalisées. Le tableau 3-2, tiré de Brusick (1983) les énumère. À ce sujet, le test de Ames est le seul pour lequel nous ayons une certaine indication de la capacité du test à reconnaître les cancérogènes en fonction de leur appartenance à une classe de composé chimique donnée. Le tableau 3.3, tirée de Rinkus et Legator (1979) représente la compilation la plus complète à ce jour des différentes classes de composés testés par le test de Ames. Ces résultats ont été confirmés en partie par Waters et al., (1982). On peut cependant remarquer que plusieurs des conclusions sont basées sur un nombre très limité de produits.

Tableau 3.2

Corrélation entre le test de Ames et
les tests * d'oncogénicité chez les animaux

Référence	Nombre de produits testés	Sensibilité (pourcentage)	Spéficité (pourcentage)	Valeur prédictive (pourcentage)
McCann et al. (1975)	300	90	87	92
Sugimura et al. (1976)	241	93	77	87
Purchase et al. (1978)	120	91	93	93
Simmon. (1979)	92	64	77	90
Anderson et al. (1979)	221	90	100	100
Rinkus et Legator (1979	271	77	-	-
Bartsch et al. (1980)	180	77	57	95
Bridges et al. (1981)	42	45-70	60-80	-
EPA Gene Tox (1983)	122	63	-	-
Zieger (1983)	218	54	-	76
Water et al. (1982)	17	65	-	100
ICPEMC** (Brusick, 1982)	51	64	35	58
NCI*** (Brusick, 1982)	58	78	67	81

* Tiré de Brusick (1983)
** International Commission for protection against environment mutagens and carcinogens. (Purchase, 1982)
*** National Cancer Institute

La définition des différentes expressions du tableau est la suivante:

Sensibilité: capacité à identifier les cancérogènes. Cette valeur se calcule en établissant le rapport du nombre de cancérogènes identifiés sur le nombre de cancérogènes identifiés plus le nombre de faux négatifs (cancérogènes non détectés).

Spécificité: capacité à discriminer entre les cancérogènes et les non cancérogènes. Cette valeur se calcule en établissant le rapport du nombre de non cancérogènes correctement identifiés sur le nombre de non cancérogènes correctement identifiés plus le nombre de faux négatifs.

Valeur prédictive: capacité de prédire les cancérogènes. Se calcule en établissant le rapport de cancérogènes correctement identifiés sur le nombre total de cancérogènes plus le nombre de faux positifs (non cancérogènes identifiés comme cancérogènes).

Après analyse de ce tableau, Brusick (1983) conclut que la valeur prédictive du test de Ames pour détecter les produits cancérogènes envers le rat ou la souris est d'environ 80 pour cent. Selon Brusick (1983) les études rapportant une valeur prédictive supérieure ou inférieure à 80 pour cent présentaient des lacunes soit dans le choix des composés analysés ou dans la façon dont l'étude a été menée. À titre d'exemple, Bridges et al. (1981) ont choisi parmi leurs composés plusieurs produits qui étaient déjà reconnus pour leur incapacité à induire des mutations chez Salmonella.

Tableau 3.3

Relation entre la structure chimique des carcinogènes et leurs détections par le test de Ames.

Activité*	Catégorie**	Testé***	Positif****
Élevée	Tirozene	2	2
	Diazo	3	3
	Azoxy	4	3
	Nitroso	39	39
	Diaryl alxynyl carbonate	3	3
	Amine aromatique	43	36
	Nitroaromatique	32	32
	Polyaromatique	18	18
	Aziridine	6	6
	Oxirane	6	6
	Hétéroaromatique	13	12
	Halométhane	13	11
	N.S.O. moutarde	10	10
	sulfonate	6	6

Activité*	Catégorie**	Testé***	Positif****
Medium	Thydrazine	8	5
	Lactose	4	2
	Chloroethylène	6	4
	Inorganique	5	2
Faible	Azo	6	2
	Carlsamyl	9	3
	Phényle	5	0
	Benyodioal	4	1
	Polychloroaromatique	8	1
	Stéroide	2	0
	Antimétabolites	3	1
Non évaluable	Cyanamide	0	0
	Déphenylethane	1	0
	Stilbenediol	1	0
	Dioxane	0	0
	Anhydride	1	0
	Pyrazolinone	1	0
	Haloalkyl ether	1	1
	Sulfamilamide	0	0
	Polysaccharide	1	0
	Polymère	1	0
	Complexe métallique	0	0

* Capacité du test à détecter facilement (élevée), moyennement (médium) ou faiblement (faible) la mutagénicité des composés selon leur classe chimique.

** Catégorie de produits chimiques testés.

*** Nombre de produits testés qui sont reconnus comme cancérogènes.

**** Nombre de produits positifs parmi les produits testés.

Quant à la valeur prédictive du test de Ames par rapport aux cancérogènes humains, les données actuelles, selon Brusick (1983) sont plutôt décevantes. Cependant Bartsch et al. (1982) rendent compte de la sensibilité (nombre de cancérogènes détecté/nombre de cancérogènes détecté plus le nombre de faux négatif) du test de Ames pour détecter les cancérogènes humains, et l'estime à environ 71 pour cent.

Il n'existe cependant pas à ce jour de modèle de calcul de risque ou probabilité qu'un composé reconnu mutagène par le test de Ames soit cancérogène chez l'homme ou l'animal. Il existe encore moins de possibilité de calcul de doses journalières acceptables (DJA) à partir des informations obtenues par le test de Ames. Les raisons sont: 1° qu'il faut d'abord connaître les différences entre le métabolisme bactérien et animal des différents composés testés et, 2° qu'il faut pouvoir classifier les composés chimiques selon leur spécificité vis-à-vis des différentes souches utilisées (McCann et al. 1984).

Plusieurs raisons peuvent expliquer les faux négatifs. Le produit testé peut nécessiter une activation qui n'est pas fournie par la fraction hépatique (S-9) utilisée dans le test de Ames; le composé ne peut pénétrer les cellules cibles de Salmonella ou le composé est dégradé par les bactéries. Enfin, le produit à tester peut agir par un mécanisme qui n'implique pas une génotoxicité (n'agit pas sur l'ADN) mais il peut agir en tant que promoteur de cancer. Il est donc prévisible qu'on obtienne des faux négatifs avec le test de Ames. De savoir si d'autres tests in vitro pour la détection de cancérogènes pourraient compléter le test de Ames, il est à ce jour impossible de l'affirmer. Cependant quelques études comparant les résultats du test de Ames avec celui d'autres tests ont été réalisées. Les plus importantes sont celles de Purchase et al. (1978) et

Purchase (1982), et celles de Bartsch et al. (1982). Celle de Purchase et al. (1978) en particulier compare six tests différents dont le test de Ames, un test de transformation de cellules de mammifères (utilisant des cellules de rein de hamster) et un test de dégranulation de l'endoplasme reticulaire de foie de rats. Il en conclut par analyse statistique des résultats portant sur 120 produits dont 54 cancérogènes animaux, que les tests de mutation bactérienne et de transformation cellulaire qui toutes deux détectent les génotoxiques sont supérieurs (présentent une valeur prédictive d'au moins 90 pour cent) et de beaucoup aux quatre autres tests effectués.

Il en conclut de plus, que les deux tests (mutation bactérienne et transformation cellulaire) se complètent très bien pour le criblage de cancérogènes. À ce chapitre Barscht et al. (1980) ont également démontré que le test de transformation utilisant les cellules V79 de hamster (voir annexe 2 pour le principe du test) peut compléter le test de mutation bactérienne pour détecter plus de 90 pour cent des cancérogènes génotoxiques. Il faudra cependant attendre les résultats de plusieurs efforts de recherches avant de connaître la complémentarité des tests quant à leur valeur prédictive pour la détection de différents groupes de cancérogènes. Il est évident qu'à ce jour il manque encore un test crédible pour détecter les cancérogènes humains (métaux tels arsénique, amiante; organohalogènes tel BPC) dont le mécanisme d'action n'implique pas de génotoxicité.

Regroupant les récents développements du programme Gene Tox de l'EPA (Brusick et Auletta, 1985) et du programme ICPEMC (International commission for protection against environmental mutagene and carcinogens) (Purchase, 1982), nous pouvons conclure que sur l'ensemble d'environ 100 tests de mutagénicité décrits dans la littérature à ce jour, nous pouvons en retenir environ 12 qui sont utilisés à une fréquence suffisante pour qu'on puisse juger de leur valeur.

Le tableau 3-4 énumère ces tests et fournit une estimation de leur sensibilité, spécificité et valeur prédictive et de leur coût approximatif. Ce tableau fait abstraction des valeurs prédictives du test de Ames qui apparaissent déjà au tableau précédent.

Tableau 3.4

Valeur prédictive et coût des tests de mutagénicité *in vitro* les plus couramment employés.

Test	Coût* Can $	Sensibilité (pourcentage)	Spécificité (pourcentage)	Prédiction (pourcentage)	Références
Ames	2 600	-	-	80	
E. coli WP2	1 100	73	78	90	Poirier et DeSerres 1979
		55	81	80	DeSerres et Ashby 1981
		59	72	60	Rosenkranz et Poirier 1979
E. coli Pol A^+/A^- réparation d'ADN	540	75	67	90	Sugimura *et al.* 1967
		60	53	65	DeSerres et Ashby 1981
		39	90	93	DeSerres et Ashby 1981
Drosophile Caractère sexuel létal récessif	32 400	35	89	86	DeSerres et Ashby 1981
		79	-	-	Vogel *et al.* 1980
Analyse de chromosome (CHO)	13 500	60	75	60	DeSerres et Ashby 1981
Échange de chromatides soeurs (*in vitro*)	8 775	55	67	60	DeSerres et Ashby 1981
Mutation de cellules V79	13 500	70	50	**62	DeSerres et Ashby 1981
Analyse de chromosome (moëlle osseuse)	40 500	Aucune valeur possible			
Test des micronoyaux (souris)	15 000	43	81	84	Heddle et Bruce 1977
		58	82	89	Jensen et Ramel 1980
		48	93	92	DeSerres et Ashby 1981
		70	20	78	Wyrobek et Bruce 1975
Mutation dominante létale					
Transformation *in vitro* (cellules embryonnaires de hamster)		75	100	100	Pienta *et al.* 1977
Transformation *in vitro* CBHK21 et CL13		91	97	96	Purchase *et al.* 1978
		70	21	59	DeSerres et Ashby 1981
		88	71	81	DeSerres et Ashby 1981

* Coût en $ can estimé par Brusick et Auletta (1985) pour une analyse faite en duplicata par des firmes privées offrant ces services aux États-Unis.

** Valeur obtenue pour l'exemple des tests de mutation génétique des cellules de mammifères *in vitro* incluant V79, les cellules embryonnaires d'ovaires de hamster et de fibroblastes humains.

3.2 TESTS EFFECTUÉS DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE ET ALIMENTAIRE POUR DÉTERMINER LA TOXICITÉ DE NOUVEAUX PRODUITS

Les réglementations concernant la commercialisation de nouveaux produits de consommation humaine (pharmaceutique ou alimentaire) relèvent au Canada du ministère de la Santé et du Bien-être social (Direction générale de la protection de la santé) et aux Etats-Unis de la FDA (Food and Drug Administration).

Ces organismes ne possèdent toutefois pas de normes établies pour les tests de toxicité à effectuer sur les nouveaux produits (Leclair et Willard, 1970). En pratique, la firme industrielle qui désire mettre en marché un nouveau produit est responsable de fournir à la section appropriée de la Direction générale de la protection de la santé un plan détaillé de la batterie de tests qu'elle entend faire subir au produit. Ce protocole est ensuite analysé par les fonctionnaires du ministère de la Santé et du Bien-être social ou du FDA aux États-Unis qui les commentent (les refusent ou les acceptent avec ou sans modifications).

De façon générale, pour l'introduction de nouveaux produits, le ministère de Santé et Bien-être social à l'instar du FAD américain, exige au moins un test de longue durée chez deux espèces animales (Frazer, 1967), mais parfois trois, incluant deux rongeurs et une autre espèce (Leclair et Willard, 1970) et au moins deux tests de mutagénicité *in vitro* utilisant des cellules de mammifères ou des cellules humaines (C. Vézina, communication personnelle). (Pour les tests les plus utilisés, voir Tableau 3-4)

Il faut aussi préciser que souvent, dans l'industrie, le test de Ames sert systématiquement pour sélectionner, parmi les composés ayant une action biologique identique, ceux qui à valeur égale ne sont pas mutagènes. L'industrie s'évite par cette stratégie des coûts inutiles de recherche et de développement sur des produits qui à la fin risquent de ne pas être commercialisables à cause de leurs effets toxiques (C. Vézina, communication personnelle). Il va de soi qu'en ce sens le test de Ames a une très grande influence depuis quelques années sur le développement des nouveaux produits mis en marché.

3.3 UTILISATION DES TESTS DE TOXICITÉ POUR L'ANALYSE DES EAUX

Les tests de toxicité ont été utilisés dans un grand nombre de situations différentes, pour l'analyse de plusieurs types d'eau. Nous ne prétendons pas, ni ne jugeons utile, à ce point, de faire une revue exhaustive du sujet. Il sera cependant utile, à cause de l'absence d'exemples identiques au cas de la ville de Mercier de répertorier les études où des tests de toxicité ont été appliqués à des échantillons d'eau potable.

Considérant en premier lieu les tests de toxicité in vitro, ce sont surtout les tests de génotoxicité (notamment le test de Ames) qui ont été utilisés. L'emploi de ces tests a surtout servi à détecter les mutagènes générés par la chloration ou l'ozonation de l'eau.

Au Canada, quelques études (Nestmann et al., 1983) effectuées avec des échantillons d'eau potable de villes canadiennes révèlent dans tous les cas, la présence d'une activité mutagène pour les cellules de salmonelles TA100. Exprimée en terme de révertants par plaque, l'activité est environ 1 à 5 X 10^2 révertants/plaque/mg de résidu organique. Dans ces études,

environ 10 mg de résidu organique étaient obtenus à partir de 200 litres d'eau extraits sur colonne XAD-2. Incidemment, dans une étude semblable réalisée par Loper et Tabor (1982) et portant sur des concentrats d'eau potable de Seattle (U.S.) préparés par extraction sur résine XAD, l'activité mutagène envers la souche TA100 était aussi d'environ 4×10^2 révertants/plaque/mg de résidu. Dans ces deux études, la dose inférieure immédiate (0,5 mg) ne donna pas d'activité. Il faut cependant avouer que cette activité est très faible si elle est rapportée en terme de litre d'eau non concentrée puisqu'en appliquant une règle de trois on peut calculer qu'il faut concentrer 20 litres d'eau pour détecter une activité mutagène.

Des résultats semblables à ceux de Nestmann au Canada ont aussi été obtenus par Kool (1983) sur des échantillons d'eau potable du Nétherland. Grabow et al. (1985) ont aussi mis en évidence par le test de Ames une activité mutagénique dans des échantillons d'eau potable provenant du fleuve Vaal en Afrique du Sud. Dans ce dernier cas, le test de Ames fut effectué en utilisant de l'eau non concentrée. Les résultats indiquaient une activité mutagénique plus élevée dans les eaux traitées que dans l'eau brute. Ces auteurs ont attribué l'activité mutagénique de l'eau traitée à la présence de composés organiques mutagènes générés au cours du processus de chloration. Tabor et al. (1980) ainsi que McCarthy et al. (1980) ont fait des observations similaires aux États-Unis et Forster et Wilson (1981) en Angleterre. D'autres études ont aussi été effectuées pour tenter d'identifier les constituants mutagènes de l'eau potable. (Williams et al, 1982; Bull, 1984; Nestmann (1983); Tabor et Loper, 1985). Toutefois ce domaine dépasse le mandat du présent contrat.

Quant à l'analyse toxicologique de l'eau potable provenant de nappes souterraines polluées, nous avons identifié un seul cas dans la littérature. Nellor et al. (1981) ont tenté de fractionner par chromatographie et d'identifier par le test de Ames, les agents mutagènes présents dans une nappe d'eau polluée de la région de Montebello Forebay de Los Angeles comme nous l'avons déjà rapporté (section 2.2). Cette nappe fournit une quantité substantielle des eaux domestiques de la région. La contamination provient du fait que la nappe fut rechargée pendant environ 20 ans par des effluents secondaires et tertiaires. L'étude révéla que l'activité mutagène ne peut pas être imputée à un composant organique identifiable. Nellor et al. (1981) ont suggéré que l'activité mutagène observée serait plutôt attribuable à un effet additif (ou synergique) de l'ensemble des micropolluants présents.

On voit qu'un grand nombre, sinon la plupart des études préliminaires pour l'analyse des toxiques de l'eau ont été accomplies en utilisant le test de Ames. Même si ce test à une bonne crédibilité pour détecter les cancérogènes, on suggère aussi en général d'utiliser le test de Ames en combinaison avec d'autres tests in vitro pour augmenter la valeur prédictive des résultats (NRC, 1982; Draper, 1979).

Des études effectuées en utilisant les tests de transformation cellulaire in vitro (notamment avec les cellules BALB/ST3) (Lang et al., 1980) et des tests de mutagénicité de cellules de mammifères (cellules V79 de Hamster) (Gruener, 1979 et Gruener et Lockwood, 1980; Meier et Bull, 1984) détectent des activités pour des concentrations plus faibles d'échantillons d'eau potable chlorée que dans le cas du test de Ames. Ces résultats suggèrent que ces tests seraient plus sensibles que le test de Ames pour rechercher l'activité mutagénique de mélanges complexes de micropolluants.

Quant à l'emploi de tests de cytotoxicité in vitro pour évaluer la toxicité de l'eau potable, ils n'ont, à notre connaissance, été utilisés qu'une seule fois par un groupe de chercheurs français (Hémon et al., 1978) qui ont analysé des concentrats d'eau potable de trois villes françaises. Les concentrats étaient dans ce cas obtenus par extraction ou chloroforme utilisant de très grands volumes de ce solvant. Bien que l'étude ait démontré une certaine activité cytotoxique (inhibition de la croissance cellulaire) pour des cellules de mammifères, aucune étude de mutagénicité n'a été réalisée.

Existe-t-il une corrélation entre la détection d'une activité mutagène d'un mélange complexe et l'activité cancérogène de ce même mélange ? À ce jour, selon le Comité d'expert du CNR (1982) il est impossible de répondre à cette question. De fait, comme nous l'avons déjà vu, il existe une assez bonne corrélation entre les activités mutagènes et cancérogènes de produits chimiques purifiés (la majorité des cancérogènes sont aussi mutagènes). Toutefois, dans le cas du test de Ames, nous n'avons pas de données à ce jour qui nous permettent de prédire la réponse (activité-mutagénique envers les salmonelles) lorsqu'on teste un mélange de composés et il est fort possible (Nellor, 1981) que l'activité mutagène d'un mélange puisse être attribuable à un effet additif des produits présents, plutôt qu'à la présence d'un seul mutagène. Dans le cas de tests in vivo, nous sommes encore très loin de pouvoir prédire l'effet chez les animaux de l'administration d'un mélange complexe contenant de faibles concentrations de micropolluants. (EPA, 1980). Les études permettant de répondre à cette question sont en pratique impossibles à réaliser à cause du nombre considérable d'animaux qui serait exigé pour fournir des résultats valables statistiquement.

À notre connaissance, une seule étude (Kool, 1983) a évalué l'activité cancérogène, chez la souris, de concentrats d'eau potable qui s'étaient avérés actifs dans le test de Ames. Dans cette étude, pour des doses 1000 x supérieures à la consommation équivalente humaine, aucune activité cancérogène n'a été détectée chez la souris.

D'autres études chez les animaux, de toxicité sub-aiguë (Gruener, 1979) ou de toxicité sur le système de reproduction (Staples et al., 1979; Chernoff et al., 1979) ou d'activité tératogène Kavlock et al., (1979) de concentrats d'eau potable variant entre autre 1000 et 3000 fois la dose normale humaine n'ont révélé aucun signe de toxicité chez la souris.

3.4 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons décrit en détail les différentes méthodes d'analyse de toxicité des produits chimiques.

Bien qu'il soit essentiel, pour juger de l'acceptabilité d'un produit destiné à la consommation humaine, d'extrapoler la dose toxique à partir de tests réalisés chez les animaux, ces tests sont très longs et coûteux. Il est donc avantageux d'utiliser une batterie de tests de génotoxicité rapides in vitro pour obtenir des résultats préliminaires permettant de guider le reste des analyses. Aussi, dans ce chapitre, en plus d'une description des protocoles d'analyse de toxicité chez les animaux et des méthodes d'extrapolation des résultats à l'homme, nous avons présenté une évaluation des différents tests de génotoxicité rapides in vitro qui sont disponibles à ce jour.

Le protocole général pour le test de toxicité animal comprend trois phases (toxicité aiguë, toxicité subaiguë et toxicité chronique).

La toxicité aiguë constitue l'ensemble des effets nocifs survenant très peu de temps après l'administration d'un produit. La méthodologie la plus utilisée pour l'évaluer est la détermination de la dose léthale médiane (LD50). Cette valeur ne sert pas à extrapoler la toxicité chez l'homme mais plutôt à déterminer les niveaux de doses à administrer aux cours des deux phases suivantes d'analyse (toxicité subaiguë et chronique).

La toxicité subaiguë implique en général une exposition quotidienne pendant une période atteignant jusqu'à 90 jours. Elle fournit des renseignements sur les effets toxiques principaux des produits et sur les organes cibles affectés. Les résultats de cette étude permettent aussi de concevoir les épreuves de toxicité chronique. La recommandation minimale pour les études de toxicité subaiguë exige l'utilisation de deux espèces animales dont une de rongeur. On utilise traditionnellement le rat et le chien.

L'objectif essentiel de l'étude de toxicité chronique est de déterminer la nature et la gravité des effets toxiques et la dose de "non-observation d'effets indésirables". Parmi les effets de toxicité chronique, l'oncogénicité du produit est la plus recherchée. La toxicité chronique est établie chez le rat et le chien, utilisant un nombre suffisant d'animaux pour permettre l'évaluation statistique des résultats.

Au chapitre de l'extrapolation des résultats à l'homme, il existe deux approches distinctes. La première implique une détermination de la dose maximale non toxique chez un animal sensible (seuil de tolérance) et l'application d'un facteur de risque pour le transposer à l'homme. La seconde méthode consiste à extrapoler les doses toxiques minimales à partir de la courbe dose-réponse établie chez l'animal cible.

La première méthode d'extrapolation se fonde sur l'observation que la plupart des courbes doses-réponses présentent une forme sigmoïdale qui s'explique par l'existence d'un seuil de tolérance à un agent chimique. Le

facteur de risque pour transposer cette valeur en dose journalière admissible (DJA) chez l'homme est généralement fixé arbitrairement entre 1 et 5000. Très fréquemment on utilise 100, mais il n'existe pas de base scientifique établie pour l'estimation de ce facteur de risque.

Pour les cancérogènes de l'environnement, l'extrapolation à partir du seuil de tolérance animale est difficile pour deux raisons: 1) les analyses de toxicité chez les animaux, pour des raisons de coûts, sont effectuées à de très fortes doses par rapport aux doses auxquelles l'homme est généralement exposé; 2) les cancérogènes génotoxiques, comme les radiations ionisantes, n'ont pas de seuil de tolérance. Il suffit d'une seule molécule pour déclencher le processus susceptible de mener à un cancer.

La deuxième méthode d'extrapolation "méthode d'extrapolation de faibles doses sur la courbe dose requise" est la méthode de choix pour les cancérogènes de l'environnement. Il existe plusieurs modèles mathématiques pour effectuer cette extrapolation. Nous avons présenté deux modèles, chacun basé sur une approche de calcul différente. Le modèle de Mantel et Bryan est reconnu par l'OSM, mais n'a pas la faveur de l'EPA. Ce modèle purement mathématique a le désavantage de ne pas rendre compte de nos connaissances biologiques actuelles sur le développement des cellules cancéreuses. Par contre, ce modèle n'utilise qu'une seule équation qui peut être résolue d'une façon simple.

Le second modèle, celui de Crumps est plus complexe et fait appel à une série d'équations qui représentent les différentes variables susceptibles d'affecter la probabilité qu'une cellule exposée à un agent cancérogène devienne cancéreuse. Ce modèle a cependant l'avantage de rendre compte des modèles récents de développement de cellules cancéreuses. Pour la

résolution des équations de Crumps, en pratique on utilise un programme informatisé appelé programme GLOBAL 79.

Les tests de toxicité rapides in vitro comprennent les tests de cytotoxicité et de génotoxicité. Ces derniers sont d'importance primordiale puisque la plupart des cancérogènes sont génotoxiques et nous avons décrit ces tests et évalué leur coût et valeur prédictive. À ce jour, il n'existe pas de modèle mathématique pour extrapoler à l'homme les résultats des tests de mutagénicité in vitro. Cependant, ces tests sont largement utilisés pour l'évaluation préliminaire de la toxicité des produits de consommation humaine, à cause du coût considérable que représente l'évaluation de la toxicité chronique animale.

Pour plus de 90 pour cent des 800 composés reconnus mutagènes, l'activité mutagénique a été révélée par l'un ou l'autre des essais utilisant Salmonella thyphimurium ou Escherichia coli. Exception faite du test utilisant la drosophile, le test de Ames (avec S. thyphimurium) est le seul pour lequel nous possédons des informations adéquates sur les faiblesses et particularités techniques du test. Aussi, nous connaissons les composés chimiques dont l'activité mutagénique n'est pas détectée par le test et plusieurs études comparatives ont été effectuées dans plusieurs laboratoires pour établir la reproductibilité de ce test.

La valeur prédictive du test de Ames (capacité de prédire les cancérogènes animales lorsqu'un groupe de substances choisies au hasard est testé) est de 80 pour cent. De savoir si d'autres tests in vitro pourraient compléter les résultats du test de Ames (détecter les composés non détectés par le test de Ames), il est à ce jour impossible de l'affirmer. Quelques études seulement, comparant les résultats du test de Ames à ceux du test de transformation cellulaire ont été réalisées et ces études

portaient sur un nombre limité de produits. Il semble a priori que ces tests peuvent se compléter, mais il faudra encore plusieurs efforts de recherche avant de connaître les complémentarités des tests quant à leur valeur prédictive pour la détection des différents groupes de cancérogènes.

À ce chapitre, la plupart des recommandations pour l'analyse de produits de consommation humaine incluent l'emploi d'au moins deux tests de génotoxicité dont l'un bactérien, en présumant (sans démonstration établie) qu'il existe une complémentarité entre les différents tests.

Enfin, de la centaine de tests de génotoxicité décrite dans la littérature, une douzaine tout au plus a été utilisée assez fréquemment pour pouvoir juger de leur valeur prédictive envers les cancérogènes animaux et de leur coût approximatif.

Pour compléter ce chapitre, nous avons montré la démarche d'utilisation des tests de toxicité dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire et nous avons discuté de leur utilisation pour l'analyse de l'eau. En particulier, dans le cas des eaux de consommation, le test de Ames a souvent été utilisé pour détecter les mutagènes générés par les traitements servant à stériliser l'eau.

Chapitre 4

RÉPERTOIRE DES MÉTHODES DE CONCENTRATION DES MICROPOLLUANTS DE L'EAU.

4.0 RÉSUMÉ

Dans ce chapitre nous répertorions et décrivons les principales méthodes qui pourraient servir à concentrer les micropolluants de l'eau pour analyse toxicologique. Nous évaluons également ces méthodes quant à leur efficacité à extraire les polluants, leur coût, leur facilité d'application et leur utilité pour comparer les résultats obtenus avec d'autres études semblables.

4.1 GÉNÉRALITÉS

Puisque les tests de toxicité exigent qu'un facteur de concentration soit considéré dans le calcul des doses administrées aux animaux et cellules cibles, il est important, dans le cas de l'analyse d'échantillons d'eau potable (où les solutés sont en très faible concentration) d'avoir recours à des méthodes de concentration d'eau qui reproduisent le plus fidèlement possible en proportion, la composition originale de l'eau à analyser.

Kopfler (1982) considère deux catégories de méthodes utiles pour concentrer les micropolluants de l'eau.

1- Les méthodes de concentration proprement dites, où l'eau est retirée. Ces méthodes incluent la congélation, la lyophilisation, la distillation sous vide, l'osmose inversée et l'ultrafiltration.

2- Les méthodes de concentration par enrichissement où le polluant est retiré de l'eau. L'extraction par les solvants organiques et l'adsorption sur résines représentent deux exemples.

Le tableau 4-1 donne un aperçu des différentes méthodes disponibles que nous décrirons dans les lignes qui suivent.

4.2 MÉTHODES DE CONCENTRATION PROPREMENT DITES

4.2.1 Concentration par congélation

Cette méthode a été suggérée par Shapiro (1961) pour la concentration des résidus organiques et inorganiques d'échantillons d'eau. Le procédé consiste à congeler l'eau sous forme de coquille de glace pure, laissant au centre un concentrat des solutés présents dans l'échantillon original. La méthode fut évaluée par Baker (1969) et (1970) mais n'a pas beaucoup servi pour l'analyse de la toxicité des micropolluants de l'eau (Kopfler, 1982). La méthode est d'apparence simple et permet de récupérer tous les composés, incluant les inorganiques et les organiques volatils et non volatils. Bien que la proportion des différents composés présents dans l'échantillon original soit conservée, le rendement de récupération de la matière organique diminue en fonction de la concentration en ions inorganiques de l'échantillon (Baker, 1970). Shapiro (1961) a construit un "appareil maison" pour la congélation de volumes d'eau atteignant jusqu'à 300 litres.

TABLEAU 4.1. Méthodes de concentration des micropolluants de l'eau.
(d'après Joley, 1982)

Méthode	Types de produits concentrés/nature du concentré	Avantages	Désavantages	Recommandation de l'EPA	Utilisation en relation avec des tests biologiques
Concentration par le gel	.polaires et non polaires. concentré aqueux	.basse température	.petits volumes .concentration limitée .concentration des sels .pas d'appareil manufacturé		Shapiro (1961) Baker (1970) W.R. Chappell et (1979)
lyophilisation	.non volatils .concentré aqueux ou non aqueux	.basse température .concentration élevée	.concentration des sels .matériel dispendieux contamination par huile de pompe. encombrant .coût .énergétique élevé. lent	volumes 100 L pour test *in vitro*	Cumming et al. (1979) Bieri R.N. et al. (1979)
Distillation sous vide	.non volatils .concentré aqueux ou non aqueux	.température ambiante élevée. peu de contamination	.petits volumes .concentration des sels .perte de volatils		Cumming et al. (1979)
Osmose inverse	.poids moléculaire 200 .concentré aqueux	.température ambiante .appareillage manufacturé	.concentration des sels .contamination	volume 100 L	Neal (1980) Loper (1980)
Ultra filtration	.poids moléculaire 1000 .concentré aqueux	.température ambiante	.concentration des sels	volume 100 L	
Extraction à l'aide d'un solvant	non polaires volatils concentré non aqueux	.température ambiante, sels peu concentrés .volumes importants	.contamination par le solvant. spécificité .conservation difficile du concentré	volume 100 L (si on peut récupérer le solvant)	Hemon et al. (1978) Cabridenc et Sdika (1979)
Échangeurs d'ions	.polaires .non polaires	.volumes importants bonne .récupération du c.o. (70-90 p. 100) .appareillage simple	.contamination et purification de la résine	volume 100 L	Baird et al. (1980) Jonhston et Ferdeyen (1981)
Resines macro réticulaires	.non polaires à polaires .non volatils	appareillage simple. température ambiante. volumes important	.contamination et purification de la résine. .Récupération limitée des composés absorbés	volumes 100 L	Cheh et al (1980) Neal (1980)
HPLC - C18	.Non polaires et polaires	.séparation possible des différents micro-polluants	.Appareil complexe - .volume au dessus de 10L très long		W.R. Chappel et al. (1979)

Pour que la concentration s'effectue correctement, il est essentiel que l'eau subisse une agitation lente tout au long du processus de congélation. Selon Kopfler (1982), il n'existe pas d'appareil commercial pour la congélation de gros volumes. Notre recherche bibliographique nous a cependant permis de constater que la compagnie Virtis a mis en marché un appareil "Freeze concentrator" (Virtis Co., Gardiner, N.Y.) pour congélation de gros volumes. Une unité est encore utilisée par le laboratoire "Water Quality labs of U.S. Geological Survey, Lakewood, Colorado".

4.2.2 Lyophilisation

La lyophilisation est un procédé par lequel l'eau est retirée par sublimation sous vide de l'échantillon congelé. C'est un procédé lent et coûteux (en énergie et en appareillage) (Kopfler, 1982). Cette méthode permet de concentrer de grands volumes d'eau, mais plusieurs autres désavantages s'ajoutent à celui du coût incluant la perte des produits volatils, la concentration simultanée des ions métalliques qui interfèrent avec les tests de toxicité in vitro et enfin, la possibilité de contamination par les huiles de la pompe à vide (Bieri et al., 1979). Pour les analyses d'échantillons de l'environnement, la stérilisation par filtration est recommandée avant la lyophilisation (Ross et al. 1982). Pitt et Scott (1973) ont évalué le rendement de récupération de plusieurs composés organiques ajoutés intentionnellement à des échantillons d'eau. Les résultats indiquent que le rendement de récupération des composés organiques volatilisables est très faible, incluant les phénols et les chloro- et hydroxy-benzoates.

4.2.3 Évaporation ou distillation sous vide

La méthode consiste à amener l'eau à ébullition sous vide, à une température près de la température ambiante. Elle a été utilisée pour des analyses chimiques (Joley et al., 1975) et pour des analyses biologiques (Johnston et Herron, 1979). Selon Kopfler (1982), pour la plupart des échantillons, le rendement de récupération de la matière organique totale est relativement élevé. Le problème majeur de cette méthode, comme pour la lyophilisation, est la concentration simultanée des ions métalliques de l'échantillon.

4.2.4 Osmose inversée

Par cette procédure, l'eau est chassée vers l'extérieur d'une membrane semi-perméable en applicant une pression externe supérieure à la pression qui prévaut de part et d'autre de la membrane. Il existe plusieurs systèmes d'osmose inversée commerciaux et ceux-ci fonctionnent généralement à base de membrane de cellulose acétate ou de polyamide (nylon). Les polyamides sont plus stables aux pH acides et alcalins, mais ces membranes sont très sensibles au chlore et sont donc inutilisables pour concentrer de l'eau traitée chlorée.

La membrane de cellulose acétate exclut le passage de toutes les molécules organiques dont le poids moléculaire est inférieur à 200 et exclut entre 90 et 97 pour cent des ions inorganiques.

Cette méthode, proposée par Kopfler et al. (1977) pour la concentration des micropolluants de l'eau a été utilisée par plusieurs laboratoires (Neal, 1980; Loper, 1980; Robinson et al., 1982; Ross et al. 1982), mais souvent en combinaison avec d'autres méthodes d'extraction. L'osmose inversée ne permet toutefois pas de concentrer également tous

les solutés présents dans l'échantillon original. Le facteur de concentration de chaque soluté est fonction du degré d'exclusion du composé par la membrane.

Tous les procédés de concentration décrits ci-haut conduisent à la formation de résidus constitués de substances organiques et inorganiques. La récupération de ces composés est affectée par le solvant utilisé pour les solubiliser et par le degré de précipitation des résidus au cours du processus de concentration. Kopfler et al. (1977) suggèrent d'adoucir l'eau par un échangeur d'ions type Donan utilisant une membrane tubulaire Nafion (Dupont) avant d'effectuer la concentration par osmose inversée.

4.3 MÉTHODES DE CONCENTRATION PAR ENRICHISSEMENT

4.3.1 Extraction par des solvants organiques

La méthode consiste à extraire les composés organiques présents dans l'eau au moyen de solvants organiques immiscibles. Cette méthode nécessite cependant une extraction continue par de grands volumes de solvants. Le problème majeur est la possibilité de contaminations provenant de contaminants présents dans les solvants, par exemple les grades supérieurs de chlorure de méthylène sont souvent contaminés par du cyclohexane. Un deuxième inconvénient est la trop grande spécificité de récupération des toxiques de l'eau en fonction de la polarité des solvants utilisés. Peu d'auteurs ont utilisé cette méthode pour l'analyse des micropolluants des eaux, sinon une équipe de chercheurs français (Hémon et al, 1978).

4.3.2 Méthode de concentration par adsorption et élution

Ces méthodes sont les plus simples et les moins coûteuses. L'échantillon d'eau est circulé au travers d'une colonne contenant l'adsorbant et la matière organique retenue est éluée avec un solvant approprié. Les adsorbants les plus utilisés incluent le charbon activé, les résines échangeuses d'ions, les résines macroréticulaires et les colonnes de chromatographie à haute performance de type "phase inversée" (Reverse phase HPLC column).

4.3.2.1 Charbon activé

Le charbon activé a longtemps été utilisé pour retenir et séparer les composés organiques à partir d'échantillons aqueux. Cependant, dans le cas de la concentration des micropolluants de l'eau, le charbon activé donne de très mauvais rendements de récupération (Chriswell et al., 1977).

4.3.2.2 Résine adsorbante macroréticulaire

Les résines adsorbantes macroréticulaires sont produites par Rhom et Haas sous la désignation de résine Amberlite XAD. Deux types sont disponibles, soit un polystirène (XAD-2 et XAD-4) ou un ester d'acrylique (XAD-7 et XAD-8) qui varient selon la polarité, la porosité et la surface d'échange du matériel (Dressler, 1979; Gustafson et Paleos, 1971) (voir annexe 3, pour les détails sur cette résine). Ces résines contiennent des contaminants de faible poids moléculaire et doivent nécessairement être extraites successivement au méthanol, à l'acétonitrile et à l'éther éthylique avant de servir pour l'isolement des micropolluants de l'eau. Une méthode détaillée pour l'utilisation de résines XAD pour l'analyse de

micropolluants a été décrite par Junk et al. (1974). Les résines XAD ont une très grande affinité pour les composés hydrophobes et peuvent même retenir ces composés lorsque le débit d'eau est élevé. Toutefois, pour les composés hydrophiles, qui constituent la majeure partie de la matière organique de l'eau, Thurman et al., (1978) ont démontré que la capacité de rétention de ces résines est beaucoup plus faible. Les résines non ioniques d'ester d'acrylique (XAD-8) sont plus polaires et plus efficaces pour récupérer les hydrophiles (Tabor et Loper, 1985). Guy LeBel, Santé et Bien-être social Canada, (Communication personnelle) estime à environ cinq pour cent le rendement de récupération de la matière organique de l'eau par la colonne XAD-2. Cette fraction contient cependant la grande majorité des micropolluants toxiques de l'environnement. Récemment, il a été proposé de coupler la résine XAD-2 à XAD-7 pour augmenter le rendement de la matière organique (Tabor et Loper, 1985).

La récupération des composés organiques ionizables peut être effectuée au moyen d'une solution aqueuse acide ou basique. Les composés neutres sont élués avec des solvants organiques; les plus souvent utilisés sont l'éther éthylique, le méthanol, l'acétone et le chlorure de méthylène.

Les résines XAD restent parmi les techniques de concentration de la matière organique les plus avantageuses. Malgré que cinq pour cent seulement de la matière organique soit récupérée, il reste que cette technique est facile d'application, peu coûteuse, et permet de récupérer la plupart des micropolluants toxiques connus.

4.4 MÉTHODES DE CONCENTRATION MIXTE

Puisque tous les auteurs reconnaissent qu'il n'existe pas de méthode qui permette de concentrer les micropolluants pour obtenir un concentrat

dont chacun des constituants se retrouve dans les mêmes proportions que dans l'échantillon d'eau original, plusieurs auteurs ont suggéré des procédures de concentration constituées du couplage de différentes techniques citées plus haut.

4.4.1 Procédure de Kopfler et al. (1977)

Cette procédure de concentration est la plus utilisée par les chercheurs de l'EPA américain. La méthode consiste à faire subir d'abord à l'échantillon d'eau une osmose inversée après passage sur membrane Nafion comme nous l'avons déjà décrit. Le concentrat obtenu est ensuite extrait avec un mélange de pentane et de chlorure de méthylène puis il est chromatographié sur une colonne XAD-2 éluée à l'éthanol. Cette méthode fournit des rendements de récupération de l'ordre de 35 à 40 pour cent, mais plusieurs fractions doivent être testées.

4.4.2 Procédure de Johnston et al. (1980)

L'échantillon d'eau est chromatographié sur une colonne constituée d'une couche de gel de silice, une couche de résine échangeuse de cations et une couche de résine échangeuse d'anions. L'effluent de la colonne est évaporé sous vide pour récupérer les composés hydrophiles non volatils puis les substances absorbées sur la colonne sont éluées avec une solution de bicarbonate suivi de triethyl ammonium et d'acétone. Cette procédure n'a cependant été utilisée qu'à une seule reprise.

4.4.3 Procédure de Baird et al. (1980)

Cette procédure comporte d'abord une série de chromatographie sur colonne échangeuse d'ions puis sur colonne XAD. Les colonnes

sont éluées avec un mélange d'acétonitrile et de NaCl (4,5 M). Les auteurs rapportent un rendement de récupération de 95 pour cent de la matière organique totale. Cependant selon Kopfler (1982), l'acétonitrile interfère normalement avec les tests de détermination de la matière organique totale et Baird et al. (1980) n'avaient pas tenu compte de cet artéfact dans leur calcul de rendement.

4.4.4 Procédure de Carbridenc et Sidka (1979)

Cette méthode permet d'extraire 1000 litres d'eau avec 100 litres de chloroforme. Une extraction est d'abord effectuée à pH7, puis à pH2 et à pH10. La phase aqueuse est ensuite chromatographiée sur une série de colonnes incluant une résine échangeuse d'anions (éluée par le butanol), une colonne XAD-2 (éluée avec un mélange éthanol-chlorure de méthylène) et une colonne de charbon activé (éluée avec de l'éthanol). Ces auteurs rapportent selon Kopfler (1982) que 45 des 51 micropolluants ajoutés à leur échantillon d'eau ont été détectés dans l'une ou l'autre des fractions obtenues et le rendement de récupération de la matière organique totale était évalué à 88 pour cent.

4.4.5 Concentration par HPLC utilisant une colonne de chromatographie C18 en phase inversée.

La méthode a été proposée par Chappell et al. (1979) pour analyses des échantillons d'eau recyclée.

Les auteurs suggèrent de faire circuler l'échantillon d'eau dans une colonne préparative de 1 cm x 50 cm contenant du "Bondapack C-18 sur Porasil B" colonne obtenue de "Waters Associates". Dix litres d'eau sont en général circulés sur la colonne à raison de 7 ml/min. Les composés sur la colonne sont élués avec un mélange d'acétonitrile-méthanol.

La méthodologie est décrite en détail par Chappell et al. (1979), mais ces auteurs n'ont pas évalué les rendements de récupération. L'intérêt de cette méthode est d'abord la spécificité pour les composés hydrophobes et la possibilité de fractionner les micropolluants pour éventuellement retracer les constituants toxiques présents dans un échantillon d'eau.

Chapitre 5

MESURES PROPOSÉES PAR L'ENVIRONNEMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) DES ÉTATS UNIS POUR ÉVALUER LA TOXICITÉ ET LES RISQUES DE CONSOMMATION D'EAU POTABLE ET D'EAU RECYCLÉE

5.0 RÉSUMÉ

L'EPA s'est penché sur les méthodes d'analyses méritant d'être retenues pour évaluer la toxicité de l'eau potable et en particulier de l'eau potable recyclée qui est un exemple d'eau potable contaminée par un mélange de micropolluants. À titre d'exemple, nous résumerons dans le présent chapitre les opinions de Comités d'experts de l'EPA et du "National Research Council" des États-Unis concernant les protocoles susceptibles d'assurer une qualité adéquate pour consommation humaine d'eau potable contaminée par des mélanges complexes de micropolluants.

Le protocole recommandé nécessite d'abord l'analyse de la génotoxicité d'extraits organiques des échantillons d'eau en faisant appel à des tests rapides de toxicité in vitro (incluant le test de Ames). Cette étape du protocole est essentielle pour deux raisons:

D'abord, elle fournit une indication préliminaire, rapide et à coût modique de la qualité et de l'acceptabilité de l'eau et surtout, elle permet de vérifier la présence d'agents mutagènes (possiblement cancérogènes) que les techniques d'analyse chez les animaux peuvent difficilement mettre en évidence.

En effet, la plupart des techniques d'analyse de mutagénicité rapide in vitro, comme le test de Ames sont très sensibles, et peuvent détecter des mutagènes à des concentrations beaucoup plus faibles que les concentrations requises pour mettre en évidence un effet chez les animaux.

La première étape inclut également des tests de toxicité aiguë, subaiguë et de tératogénicité chez l'animal, portant sur une période d'au plus quatre semaines.

Il est admis que les tests de toxicité rapides doivent indiquer l'absence de mutagènes et de toxiques avant de poursuivre aux étapes subséquentes.

Le essais de toxicité subchronique allant jusqu'à 90 jours et de toxicité chronique (incluant la cancérogénicité) constituent les deuxième et troisième étapes du protocole recommandé par les agences gouvernementales. Ces étapes sont aussi essentielles, car à ce jour, nos connaissances scientifiques ne nous permettent pas d'extrapoler à l'homme les résultats de tests de toxicité effectués avec d'autres systèmes que le système animal. Parmi les difficultés rencontrées, il faut mentionner en outre qu'il n'a pas été établi de façon certaine que tous les mutagènes sont nécessairement des cancérogènes et il est admis qu'inversement, environ 20 pour cent des cancérogènes ne sont pas des mutagènes. De plus, à ce jour, nous possédons plusieurs modèles mathématiques permettant d'extrapoler à l'homme les résultats d'analyse de tests de toxicité effectués chez les animaux; il n'existe cependant pas de modèles pour l'extrapolation à l'homme des analyses effectuées dans les systèmes rapides in vitro. Dans ce chapitre nous décrivons également la méthode d'extrapolation suggérée par l'EPA pour assurer une qualité acceptable pour l'homme des eaux de consommation contaminées par des mélanges de micropolluants toxiques. Enfin, le chapitre énumère les méthodes retenues par l'EPA pour concentrer les solides des eaux à analyser.

5.1 STRATÉGIE POUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ

Dans l'étude intitulée "Quality-Criteria for Water Reuse" (National Research Council, 1982) un Comité d'experts a proposé d'adopter une procédure en trois étapes pour l'évaluation de la toxicité des eaux recyclées. L'annexe 4 résume la procédure recommandée par ce Comité. Pour évaluer la toxicité d'une eau contaminée par un mélange complexe de micropolluants, deux solutions peuvent être envisagées. La première est d'identifier et de quantifier le plus grand nombre de micropolluants présents pour repérer les toxiques. La seconde consiste à effectuer des essais de toxicité sur les concentrats de l'eau. Le Comité d'experts incline plutôt pour la seconde solution puisqu'il considère impossible en pratique d'identifier tous les constituants d'une eau fortement polluée et que cette information ne pourrait permettre de mettre en évidence l'effet toxique résultant de l'effet additif ou synergique des divers micropolluants présents.

Pour l'analyse des activités toxiques de mélanges complexes de micropolluants présents dans l'eau recyclée, le Comité d'experts de NRC (1982) recommande un protocole en gradation pyramidale où des tests simples et peu coûteux sont d'abord appliqués pour déterminer l'effet sur la qualité de l'eau, des traitements ayant servi à la recycler. Une réponse négative, (absence d'activité mutagène) dans les eaux traitées serait, selon le Comité, une bonne indication que le traitement est efficace. Le Comité juge essentiel, toutefois, pour éliminer les risques liés à la consommation de cette eau qu'un test de cancérogénicité soit effectué chez les animaux pour juger de son acceptabilité.

Nous devons cependant souligner qu'aux États Unis, il n'existe pas d'usine de traitement d'eau recyclée qui serve à approvisionner la popu

lation en eau potable. Il existe quelques usines pilotes cependant, dont celle de Denver (Colo.), qui ont servi à faire des études de toxicité de ces eaux. L'usine de traitement d'eau recyclée de Winhoek (Afrique du Sud) est parmi les rares unités dans le monde qui serve à approvisionner un bassin de population (Grabow et al., 1985).

Brièvement, les différentes étapes suggérées par le Comité d'experts de NRC (1982) pour évaluer la qualité des eaux recyclées sont les suivantes.

La première étape du protocole est basée sur des tests de toxicité rapides. Elle vise à déterminer la mutagénicité et la cancérogénicité in vitro, la toxicité aiguë et subaiguë, la tératogénicité ainsi que la clastogénicité in vivo. Les tests pratiqués in vitro doivent couvrir les effets suivants: mutation ponctuelle chez les bactéries, mutation génétique et transformation in vitro chez des cellules de mammifères.

Les tests in vitro suggérés sont le test de Ames avec et sans activation enzymatique; un test de mutagénicité au locus Tk des cellules de lymphome de souris ou au locus HGPRT des cellules d'ovaires de hamster (cellules CHO);

Le test de transformation cellulaire peut être mené avec des lignées cellulaires établies ou avec des cellules embryonnaires de hamster.

Le Comité suggère de compléter cette batterie de tests par des tests cytogénétiques in vivo. Le Comité a retenu l'analyse en métaphase des cellules de la moelle osseuse.

Les tests de toxicité aiguë, subaiguë et de tératogénicité de cette première étape portent sur une période de deux à quatre semaines. Ils peuvent être menés selon des protocoles déjà établis, et modifiés selon le besoin. Ils devraient couvrir un minimum de trois doses pour les tests de

toxicité et porter sur un minimum de deux espèces dans le cas de la tératogénicité. Les résultats doivent permettre d'obtenir un profil toxicologique, d'identifier les organes cibles et les mécanismes d'action et d'établir une relation entre les effets et la dose administrée.

La deuxième étape a pour but d'évaluer les effets cumulatifs à long terme sur les différents organes et sur la reproduction et de déterminer les doses acceptables et les doses sans effets. Elle se prolonge sur une période de 90 jours qui correspond au dixième de la durée de vie des rongeurs. Les résultats sont basés sur des observations cliniques et sur l'autopsie des sujets.

La troisième étape s'avère nécessaire lorsqu'on désire extrapoler les résultats et évaluer les risques que présente pour la santé humaine, la consommation d'une eau et ce sur une période couvrant la vie entière de l'individu. Ces tests combinent les études de carcinogénicité et de toxicité chronique et devraient être effectués sur au moins deux espèces animales.

5.2 MÉTHODES D'EXTRAPOLATION SUGGÉRÉES PAR L'EPA POUR ASSURER UNE QUALITÉ ACCEPTABLE POUR L'HOMME DES EAUX DE CONSOMMATION SUSCEPTIBLES D'ÊTRE CONTAMINÉES PAR DES MÉLANGES COMPLEXES DE MICROPOLLUANTS TOXIQUES

L'une des décisions importantes dans le protocole visant à démontrer la qualité acceptable d'une eau de consommation, est de déterminer d'une part le facteur de concentration retenu pour faire le calcul des extrapolations et d'autre part, de choisir les méthodes de préparation des concentrats d'eau. À cause du peu de données scientifiques sur les méthodes de concentration, le Comité d'experts américain (NRC, 1982) recommande

l'utilisation en parallèle d'au moins deux méthodes de concentration différentes.

Quant au choix des doses, dans le cas d'essais rapides in vitro, comme le test de Ames, il est recommandé de tracer une courbe dose-réponse utilisant des concentrations qui génèrent un minimum d'artéfacts. Dans le cas des tests in vivo chez les animaux, il importe que la dose soit un multiple convenable de la dose humaine anticipée. L'EPA (1980) suggère un facteur de concentration entre 100 et 1000. Dépendant de la toxicité aiguë et subaiguë des concentrats d'eau, comme nous l'avons déjà vu (chapitre 3) pour les études de cancérogénicité chez les animaux, la dose doit être fixée à un niveau maximum qui permette encore la survie des animaux pour une période de vie normale. En pratique, nous pouvons considérer l'exemple suivant fourni par le NRC (1982) et qui utilise le rat pour la toxicité chronique.

Assumant que l'eau traitée contient 3 mg/l de matière organique et que le rat boit en moyenne 25 ml d'eau par jour et assumant une eau 100 x concentrée, (dose 300 mg/l ou 0,3 mg/ml), le facteur de concentration par rapport à la quantité de matière organique ingérée par l'homme peut se calculer selon la formule

$$\text{Facteur de concentration} = \frac{\text{Équivalent humain de la dose administrée au rat}}{\text{Consommation normale de l'homme}}$$

La consommation normale moyenne de l'homme est de deux litres par 70 kg donc, la quantité de solides ingérés par l'homme est de 6 mg/70 kg .

L'équivalent humain de la dose administrée au rat peut se calculer selon une règle de trois simple:

- dose par rat: 25 ml x 0,3 mg/ml = 7,5 mg/rat

assumant un poids moyen pour le rat de 200 g

- dose par kg de rat: $\frac{7,5 \times 1000}{200} = 37,5$ mg/kg
- dose équivalente chez l'homme: 37,5 mg/kg X 70 kg = 2,625 mg
- facteur de concentration: $\frac{2,625 \text{ mg}}{6\text{mg}} = 437$

Quant aux analyses statistiques des résultats, ce sont les mêmes que celles présentées au chapitre 3. Nous référons ici à la méthode de Crumps modifiée (Anderson, 1983).

5.3 MÉTHODES DE CONCENTRATION RETENUES PAR L'EPA

Le chapitre 4 décrit les différentes méthodes pouvant servir à concentrer les résidus solides des eaux.

De fait, à cause de nos connaissances limitées sur le sujet, aucun Comité d'étude de l'EPA (1977, 1980) ou du NRC (1982) ne recommande l'emploi de méthode de concentration spécifique. Le Comité du NRC (1984) recommande l'emploi de deux méthodes différentes pour palier à l'absence d'une méthode acceptable unique.

À ce chapitre, les évaluations déjà présentées au chapitre IV s'inspiraient largement de documents publiés par l'EPA (EPA 1980, 1977, NRC 1982).

En résumé, les méthodes de concentration par lyophilisation ou osmose inversée peuvent servir pour obtenir des facteurs de concentration élevés. Cependant, ces méthodes retiennent les sels inorganiques qui peuvent interférer dans les études de toxicité in vitro. Ces méthodes sont cependant recommandées pour préparer les concentrats requis pour les tests de toxicité chez les animaux. L'ultrafiltration, utilisant des filtres dont l'exclusion moléculaire est 1000 est une méthode pouvant servir à

concentrer les micropolluants tout en éliminant les ions inorganiques, mais plusieurs composés organiques de poids moléculaire inférieur à 1000 sont perdus. De façon générale, les filtres dont l'exclusion moléculaire est de 200 ne peuvent rejeter que cinq pour cent des sels inorganiques.

Bien que le rendement de récupération de la matière organique par chromatographie sur résine XAD soit faible, ce procédé est aussi recommandé car c'est une méthode peu coûteuse, facile à réaliser et qui concentre principalement les composants organiques neutre (80 pour cent de la matière organique extraite) qui constituent une grande partie des micropolluants de l'eau.

Chapitre 6

PROPOSITION D'UN PROTOCOLE POUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EAUX DE LA VILLE DE MERCIER ET ÉVALUATION DES MÉTHODES PROPOSÉES BASÉES SUR LES DONNÉES SCIENTIFIQUES ACTUELLEMENT DISPONIBLES.

6.0 RÉSUMÉ

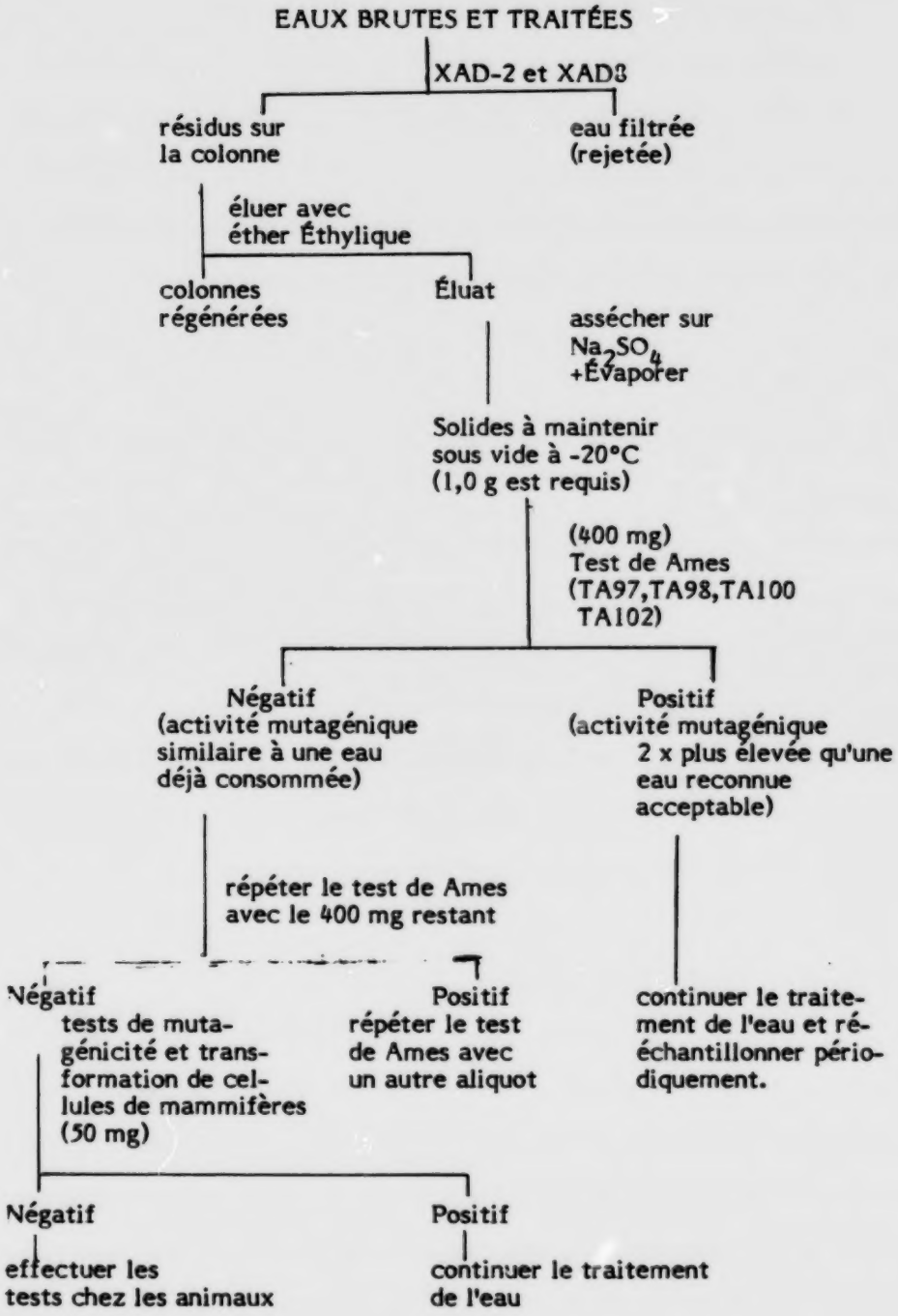
Dans ce chapitre nous décrivons en détail le protocole suggéré pour s'assurer de la qualité pour fin de consommation humaine des eaux brutes et traitées de la ville de Mercier. Il est à noter que pour suivre l'évolution du traitement en cours à la ville de Mercier pour purifier l'eau, le test de Ames effectué de façon répétée sur un concentrat préparé par adsorption sur colonne XAD serait suffisant.

Nous présentons dans les paragraphes qui suivent un résumé des différentes étapes du protocole complet que nous suggérons. La figure VI-1 résume le protocole.

6.0.1 Tests rapides in vitro

Essentiels pour obtenir des données préliminaires sur l'efficacité du traitement. Si négatifs, ces tests suggèrent que le traitement des eaux de la ville de Mercier a suffi pour éliminer ou réduire les micropolluants toxiques. Les tests rapides in vitro sont nécessairement suivis par des analyses de toxicité subaiguë et chronique chez les animaux afin d'extrapoler les quantités d'eau permissibles pour consommation humaine.

FIGURE VI-I PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES EAUX DE LA VILLE DE MERCIER



Si positifs, les résultats in vitro suggèrent que l'eau contient encore des micropolluants toxiques et qu'il faut poursuivre ou réévaluer la méthode de traitement de l'eau.

6.0.1.1 Préparation des échantillons à tester

6.0.1.1.1

Préparer suffisamment de résidus solides (1,0 g) pour deux tests de Ames et un test de mutagénicité et transformation de cellules animales à partir d'un même échantillonnage. Nous suggérons d'utiliser une colonne ou cartouche XAD directement placée à la sortie d'un robinet relié à un puits d'eau affecté. Le volume d'eau à récolter sera dépendant de la quantité de résidus organiques solides présents. Le débit devra être établi de façon à ce que l'échantillonage soit de la plus courte durée possible, remplaçant la colonne aux 48 heures s'il est nécessaire de prolonger la période de récolte. Pour anticiper le volume d'eau à filtrer, nous suggérons d'effectuer une récolte préliminaire utilisant un faible volume d'eau (10 à 1000 litres) et de déterminer le poids des résidus organiques retenus sur la colonne. Tout autre paramètre (carbone total, hydrocarbure, graisses etc.) ne pourrait pas refléter précisément la quantité de solides susceptible d'être retenus sur la résine XAD qui est à rétention sélective.

Si la quantité requise suggérée de 1,0 g de matière solide représentait des volumes d'eau trop considérable à filtrer nous suggérons de réduire en conséquence dans le test de Ames, la valeur maximale suggérée de 10 mg de matière organique par plaque puisque nous avons suggéré cette valeur en nous basant sur une eau fortement chargée en matière organique (3 mg/ l) (voir tableau 6.1, page 108).

6.0.1.1.2

La colonne est acheminée sans délai au laboratoire pour extraction à l'acétate d'éthyl. La plupart des polluants organiques sont stables, mais peuvent être photo oxydés ou oxydés par la flore microbienne qui est accumulée sur la résine.

6.0.1.1.3

Les extraits sont évaporés à vide puis les résidus solides peuvent être conservés pour de longues périodes (mois, année) à -20°C dans un dessicateur sous vide et à l'abri de la lumière.

6.0.1.2 Test de Ames

6.0.1.2.1

Solubilisation des résidus dans le DMSO ou ETOH pour obtenir des concentrations par plaques variant entre 0,1 mg et 10 mg.

6.0.1.2.2

Effectuer le test avec trois concentrations du produit à tester et deux concentrations de la préparations S-9. Le test est réalisé avec les souches TA97, TA98, TA100 et TA102.

6.0.1.2.3

Lecture des résultats (nombre de prototrophes révertants par plaques comparé au témoin sans agent). Pour l'interprétation des résultats, on considère positif un test dont le nombre de prototrophes induits est d'au moins deux fois le nombre de révertants spontanés et que la courbe dose-réponse est droite.

6.0.1.2.4

Pour l'interprétation des résultats, il faut également faire des analyses d'au moins deux autres échantillons d'eau reconnus acceptables (par exemple, eau de Montréal et eau de Laval).

6.0.1.2.5

Si le test de Ames révèle l'absence de mutagènes, il est recommandé de le répéter avec le même échantillon. S'il est positif, il est recommandé de refaire le test plus tard après une période de traitement pour vérifier si l'activité mutagénique de l'eau diminue avec le temps de traitement.

6.0.1.2.6

Si le test de Ames révèle l'absence de mutagènes, il est recommandé d'utiliser les mêmes concentrats pour effectuer un test de mutagénicité sur les cellules de mammifères et un test de transformation in vitro. Ces tests ne sont pas standardisés come le test de Ames, mais nous suggérons des protocoles aux sections 6.2.3.3 et 6.2.3.4. Puisqu'à ce jour, nous ne connaissons pas avec exactitude l'éventail des mutagènes que les tests rapides in vitro peuvent reconnaître, et puisque nous avons plusieurs indications que certains de ces tests ne peuvent reconnaître certaines classes spécifiques de composés (par exemple le test de Ames ne reconnait pas les mutagènes "Azo"), il est fortement recommandé d'effectuer plusieurs tests de génotoxicité dont le test de Ames plus deux autres tests faits avec des cellules animales, présumant que ces tests se complètent.

6.0.2 Tests chez les animaux

Lorsque les tests de génotoxicité in vitro révèlent l'absence de mutagènes, l'étape suivante lorsque l'eau est destinée à une consommation humaine, consiste à évaluer la toxicité chez les animaux.

6.0.2.1 Préparation des échantillons à tester

6.0.2.1.1

Pour l'analyse chez les animaux, les concentrats d'eau administrés à l'animal doivent être préparés quotidiennement pour ainsi évaluer sur une période de plusieurs mois (ou année) la qualité toxicologique de l'eau.

6.0.2.1.2

L'eau devrait être concentrée par osmose inversée ou lyophilisation qui fournisse des échantillons dont la teneur en matière solide (inorganique plus organique) est très représentative de la matière solide présente à l'origine.

6.0.2.1.3

Les tests chez les animaux sont conduits selon le protocole de l'EPA (annexe 7).

D'abord la quantité et le degré de concentration de l'eau administrée par voie orale sont déterminés par un test de toxicité aiguë puis les tests de toxicité subaiguë et chronique sont menés selon la procédure décrite à l'annexe 7. Les résultats servent à extrapoler la toxicité à l'homme.

6.1 PROTOCOLE GÉNÉRAL

L'évaluation de la qualité acceptable pour consommation humaine d'une eau contaminée par un mélange complexe de micropolluants est difficilement réalisable. Nous avons à ce sujet, l'opinion d'experts du ministère de la Santé et du Bien-être social du Canada (Peter Toft) et de l'EPA américain (Joseph Cotruvo et Fredericq Kopfler ainsi que Elaine Stanley) (voir chapitre 1). Le Comité d'experts du NRC (1982) considère que dans le cas d'une eau fortement contaminée par des micropolluants, il est pratiquement impossible d'évaluer l'acceptabilité de cette eau pour consommation humaine en se basant uniquement sur les résultats d'analyses chimiques (voir chapitre 5-1). En effet, le Comité juge que d'une part il est impossible de détecter tous les composants présents et d'autre part, nous ignorons, à ce jour, si les faibles concentrations de micropolluants cancérogènes peuvent se manifester par un effet additif ou synergique chez les animaux.

Cependant, il ne faut pas oublier que les études de génotoxicité et cancérogénicité de concentrats d'échantillons d'eau potable ne se sont pas avérées concluantes à ce jour. Ainsi, la plupart des échantillons d'eau traitée qui ont montré une activité mutagène envers les bactéries ou les cellules animales in vitro n'ont pas induit de cancer ou montré d'activité tératogène chez la souris (voir chapitre 3.3).

Pour l'évaluation de la qualité toxicologique des eaux de la ville de Mercier, il faudra donc agir avec beaucoup de discernement. La documentation que nous avons accumulée à ce sujet nous amène à proposer le protocole décrit dans les pages qui suivent.

Comme nous l'avons déjà suggéré dans notre soumission à l'appel d'offre du ministère de l'Environnement, et en s'appuyant sur les recommandations du NRC (1982) au sujet de l'évaluation toxicologique de mélanges complexes de micropolluants, nous croyons nécessaire d'évaluer la qualité toxicologique des eaux de la ville de Mercier sur une base biologique plutôt que par analyse chimique. Nous maintenons également notre proposition d'effectuer les tests proposés en gradation pyramidale, utilisant un test simple et moins coûteux au début, en progressant successivement vers les tests plus laborieux et plus coûteux jusqu'aux tests accomplis chez les animaux, tests qui sont nécessaires pour s'assurer de l'acceptabilité de l'eau pour consommation humaine.

Notre proposition est la suivante.

Dans un premier temps, nous suggérons d'effectuer le test de Ames sur des concentrats d'eau brute et traitée (désinfectée et non désinfectée) provenant de la nappe contaminée. À notre avis, l'activité mutagène est la principale activité toxique à rechercher dans un test préliminaire car les activités cytotoxiques générales telle la LD50 peuvent être évaluées facilement par un test in vivo de quelques jours chez les animaux.

Le test de Ames est bien sûr parmi tous les tests de mutagénicité (chapitre 3.1.2.2) celui qui nous permet le mieux de comparer nos résultats avec les données déjà existantes dans la littérature. Il est essentiel à notre avis d'effectuer le test sur de l'eau brute et de l'eau traitée désinfectée,

puisqu'il est maintenant reconnu que les processus de désinfection peuvent transformer certains composants organiques de l'eau pour augmenter son activité mutagénique. De plus, il faudra inclure des eaux témoins provenant d'autres villes pour comparer l'activité mutagénique de l'eau contaminée de la ville de Mercier avec celle d'autres localités. À ce chapitre nous avons déjà souligné (chapitre 3.3) que l'eau traitée désinfectée manifeste souvent une activité mutagénique détectable dans les tests in vitro. La méthode retenue pour concentrer les échantillons d'eau influencera grandement les résultats anticipés. Afin de pouvoir comparer la qualité de l'eau de la ville de Mercier avec celle d'autres villes au Canada (Nestmann et al., 1979) nous suggérons de concentrer les résidus organiques par extraction sur résine macro-réticulaire XAD. De plus, pour la réalisation du test de Ames, cette méthode a l'avantage de ne concentrer que les micropolluants organiques de faible polarité, et de rejeter les ions inorganiques qui peuvent souvent, à forte concentration, inhiber la croissance des cellules bactériennes ou animales en culture. Le test de Ames a déjà été réalisé avec des échantillons d'eau potable non concentrés, notamment, en utilisant les souches de Ames dans un test de fluctuation (e.i. en cultivant les cellules en milieu liquide) (Forster et Wilson, 1981). Cependant, les essais en milieu liquide peuvent parfois présenter des artefacts, par exemple lorsque l'eau contient de l'histidine. De plus, le test de Ames réalisé en milieu liquide a été beaucoup moins utilisé que le test original en milieu solide et sa crédibilité est donc limitée.

Nous aurions pu recommander une méthode de concentration en faisant appel à une combinaison de techniques de séparation (osmose inversée combinée à chromatographie XAD, par exemple). Toutefois, étant donné l'incertitude de l'efficacité de toutes ces méthodes à fournir un

concentrat représentatif de la matière organique totale présente dans l'échantillon original, la simplicité d'application de résines XAD nous a fait fortement pencher en faveur de cette méthode.

Dans une deuxième étape, si les résultats du test de Ames sont négatifs (dans deux tests successifs et indépendants), il est recommandé d'effectuer un test de mutagénicité sur des cellules de mammifères en se servant des mêmes concentrats d'eau. Il est inutile, à ce niveau d'utiliser des tests se servant d'autres bactéries, comme E. coli, car il a été démontré qu'en général, ces tests ont une valeur sélective et spécifique semblable à celle du test de Ames (Brusick et al., 1980). On considère cependant qu'il est nécessaire de compléter le test de Ames avec des tests effectués avec des cellules animales. À ce jour, sauf pour le test de Ames, nous ne connaissons pas l'éventail des mutagènes que les tests rapides in vitro peuvent reconnaître. Quant au test de Ames, il est maintenant reconnu qu'il ne peut détecter les cancérogènes faisant partie des classes suivantes: antimétabolites des acides nucléiques, composés azo; carbonyles et thiocarbonyles, composés halogènes comme les biphényles polychlorés, les stéroïdes et les promoteurs qui ne sont pas des mutagènes ainsi que les cancérogènes inorganiques comme l'amiante. Puisque nous savons que certains tests, par exemple les tests de mutagénicité avec des cellules animales, peuvent reconnaître les composés "azo", le Comité d'experts du NRCC (1982) présume qu'il existe une certaine complémentarité quant à la sensibilité de tests rapides in vitro et recommande fortement dans le cas de mélange complexe de micropolluants, d'utiliser une batterie d'au moins quatre tests de toxicité rapides in vitro avant de conclure sur la présence de mutagènes (cancérogènes) dans un échantillon. Dans des études d'échantillons d'eau, (Kopfler communication personnelle), les tests de

transformations et de mutagénèses de cellules de mammifères se sont avérés plus sensibles (détectant de plus faibles concentrations de mutagènes) que le test de Ames.

Étant donné que ces deux tests sont parmi les 12 les plus utilisés pour l'évaluation de la mutagénicité de produits chimiques, nous les recommandons donc pour l'évaluation de la toxicité des eaux de la ville de Mercier. Ils sont évidemment plus coûteux que le test de Ames mais beaucoup moins coûteux que le test d'oncogénicité in vivo et ces tests représentent une assurance de plus que les eaux à traiter ne contiennent pas plus de mutagènes que dans les autres villes du Québec.

Enfin, dans une dernière étape, pour se plier aux recommandations de toutes les agences gouvernementales nord-américaines et des organismes mondiaux de la santé, comme pour tout nouveau produit destiné à une consommation humaine et dont on ignore la toxicité, il faudra effectuer des tests de toxicité chronique chez au moins deux espèces animales. À titre d'exemple, la compagnie Ayerst faisait effectuer ce test au coût de 200 000 $ à 300 000 $ à l'extérieur de ses laboratoires (C. Vézina, communication personnelle). Les tests chez les animaux devraient être effectués avec des concentrats d'eau préparés par lyophilisation ou osmose inversée qui sont plus représentatifs de la matière solide présente dans l'échantillon original.

6.2 DÉTAIL DU PROTOCOLE

6.2.2 Méthode de concentration

Pour les tests in vitro nous suggérons de concentrer les micropolluants sur résine XAD. L'idéal serait d'utiliser en série une colonne de résine XAD-2 moins polaire suivie d'une colonne XAD-8 plus polaire comme le proposent Tabor et Loper (1985).

Les détails sur les particularités des différentes résines XAD sont présentés à l'annexe 3.

Le mode de préparation des résines XAD pour l'analyse de micropolluants a été décrit par Junk et al. (1974). D'abord il est recommandé d'éliminer les particules de fines tailles qui sont toujours présentes dans les préparations commerciales de XAD. Ces particules sont éliminées en suspendant la résine dans du méthanol à 100 pour cent et en décantant les particules qui déposent par gravité. Puisque la résine n'est pas purifiée, il est aussi essentiel de l'extraire au Soxhlet avec trois solvants (méthanol, acétonitrile et éther diethylique) pendant huit heures par solvant. La résine purifiée peut être maintenue indéfiniment dans le méthanol, en autant qu'elle baigne entièrement dans le solvant. Deux possibilités s'offrent pour former la colonne.

6.2.2.1 Colonne de verre

Montage essentiellement le même que celui présenté à l'annexe 4. La résine suspendue dans le méthanol est versée directement dans la colonne pour obtenir environ 6 cm de résine dans la colonne de 0,6 x 10 cm. La colonne est ensuite lavée avec trois portions successives d'eau bidistillée dans le verre. Le réservoir de deux litres est ensuite rempli avec l'eau à concentrer puis le débit de la colonne est ajusté à environ 30-50 ml/minute. Si le débit est trop faible on peut appliquer une pression de 1

p.s.i. au réservoir en utilisant de l'azote purifiée. Pour l'élution de la matière organique adsorbée sur la colonne, le réservoir est d'abord rincé avec deux portions successives de 10 ml d'éther éthylique qu'on fait pénétrer dans la colonne sans la vidanger. Le réservoir est enlevé puis une période d'attente de 10 minutes permet à la phase éther de s'équilibrer dans la colonne. La phase éther est ensuite recueillie en ouvrant le robinet de la colonne. Une dernière portion de 5 ml d'éther est ensuite déposée sur la colonne puis recueillie immédiatement. La colonne peut ensuite être régénérée en déposant immédiatement après l'éther, 30 ml de méthanol et en agitant la colonne pour éliminer les bulles d'air. L'éluant éther obtenu est asséché sur sulfate de sodium (2 g/30 ml), l'éther peut être évaporé sous vide ou sous jet d'azote, puis les résidus sont quantifiés. S'ils ne sont pas analysés immédiatement, il est recommandé de les conserver sous forme solide, sous vide à -20°C pour éviter les réactions d'oxydation.

Les résidus devraient être solubilisés dans le solvant approprié juste avant usage. Dans la plupart des cas, les résidus peuvent être solubilisés dans le DMSO (diméthyl sulfoxide) qui n'est pas toxique à faible concentration et solubilise à la fois les composés plus polaires et moins polaires.

6.2.2.2 Cartouche de métal

La méthode est celle de Le Bel et al. (1979), modifiée (communication personnelle). Elle est utilisée par le Laboratoire du ministère de la Santé et du Bien-être social du Canada. (Nestman et al. 1979, 1983). Les caractéristiques de la cartouche sont les suivantes:

Composition: acier inoxydable; longueur: 40,5 cm; diamètre externe: 3,8 cm; diamètre externe: 3,2 cm; volume total: 325 ml; débit (3 volumes totaux/minute, 1000 ml/min.).

Le matériel requis pour la construction de la cartouche sont:

- écrous (acier, Swagelok) 1/4" SS-402-1
- connecteur male (acier, Swagelok) 3/8" SS-400-1-6
- "O-ring" de Teflon (2,664 cm diam., 0,262 cm épaisseur)
- filet d'acier
- calotte (acier Swagelok) avec ouverture 3/8" SS-2400-C
- laine de verre
- tube (acier inoxidable) 3,81 x 40,5 cm avec une paroi de 0,305 cm.

La cartouche est d'abord remplie avec la résine purifiée puis la résine est lavée à l'acétone bidistillée dans le verre suivi d'une élution avec de l'eau purifiée (environ sept litres). Une extrémité de la cartouche est ensuite assemblée à un robinet d'eau puis l'eau est circulée dans la cartouche à raison d'environ trois volumes au total par minute (1 litre/min).

Lorsqu'une quantité suffisante de l'eau à analyser a circulé dans la cartouche, l'eau résiduelle est aspirée par le vide et la cartouche est assemblée à un réservoir et éluée avec un litre du mélange acétone/hexane 15 pour cent (v/v). L'éluant est asséché sur sulfate de sodium puis concentré par évaporation sous vide.

6.2.3 Tests de toxicité in vitro

6.2.3.1 Espace physique, ressources humaines et élimination des déchets

Dans le cas du test de Ames, un technicien entraîné en microbiologie (ou mieux un agent de recherche possédant un B.Sc.) peut effectuer le test de Ames si l'équipement nécessaire est sur place. Par contre les tests utilisant des cellules animales doivent être effectués par des expérimentateurs possédant une bonne expertise pour ce type de culture. En effet, la culture des cellules de mammifère requiert une attention particulière pour éviter d'une part les contaminations par les bactéries et surtout les virus et les mycoplasmes et pour s'assurer que la lignée cellulaire en usage ne dégénère pas à la suite des transferts successifs.

Pour tous les tests de toxicité impliquant des mutagènes, il est fortement recommandé de prendre les mesures nécessaires pour protéger l'expérimentateur. De fait, lorsqu'une firme présente un protocole d'analyse de toxicité pour un nouveau produit de consommation, le ministère de la Santé et du Bien-être social du Canada n'accepte le protocole qu'à la condition que la preuve soit faite que les analyses seront effectuées dans des conditions protégeant l'expérimentateur de tout risque (C. Vézina, communication personnelle). En conséquence, la manipulation de mutagènes devra être effectuée dans des conditions rigoureuses. Maron et Ames (1983) décrivent des conditions d'expérimentation pour le test de Ames qui pourraient s'appliquer à tout autre test de mutagénicité in vitro.

Les tests impliquant des mutagènes devraient être effectués dans une pièce à pression positive vers l'extérieur. Toutes les manipulations de mutagènes doivent être réalisées sous une hotte protectrice classe II type B à ventilation forcée directement vers l'extérieur de

l'édifice. "Nous estimons les frais pour l'achat et l'installation d'une hotte (Biological Safety Cabinet II type B) plus l'achat du contrôle de pression et d'un ventilateur à environ 25 000 $".

L'expérimentateur devrait porter des gants pour la manipulation de mutagènes. Les pesées se font généralement par différence, pour éviter de manipuler les mutagènes hors de la hotte.

Dans la mesure du possible, toute la verrerie est jetable. Après l'expérience, le matériel de travail est jeté dans des sacs de plastique à double épaisseur contenus dans des boîtes de carton. Ces boîtes sont brûlées ou enfouies selon les règlements provinciaux en vigueur pour la catégorie de produits à jeter.

6.2.3.2 Test de Ames

6.2.3.2.1 Principes

Le test de Ames utilise des souches de Salmonella typhimurium mutantes qui ont un besoin essentiel pour l'histidine et ne peuvent croître qu'en présence de ce facteur de croissance. Lorsqu'elles sont exposées à un agent mutagène, certaines mutations dans le gène responsable de la synthèse de l'histidine rétablissent la capacité de la souche à produire elle-même l'acide aminé, rétablissant ainsi la capacité de la souche à croître en son absence. On dit alors qu'une "mutation inverse" au site histidine a permis le retour vers la prototrophie. Des mutations spontanées (sans exposition à un agent mutagène) peuvent avoir le même effet, mais les bactéries exposées à un agent mutagène auront un taux de "mutation inverse" plus important que le taux de réversion spontanée. Les bactéries mutantes inverses, peuvent être détectées par la production de co-lonies de croissance à la surface de boîte de Pétri contenant un milieu de culture solide dépourvu d'histidine.

Il y a deux autres particularités au test de Ames. D'abord, le test emploie un homogénat de foie de mammifère (fraction S-9) pour simuler le métabolisme animal envers les agents testés. Cette simulation permet de détecter les agents mutagènes qui doivent être activés par transformation biologique sous une forme électrophilique. La fraction S-9 est elle-même préparée à partir d'animaux qui ont été exposés à des agents inducteurs tels les biphényles polychlorés ou les phénobarbitales qui sont reconnus pour leur capacité à favoriser la production des enzymes d'activation (oxygénases) par les cellules du foie.

L'autre particularité du test, est qu'elle emploie des souches bactériennes développées en laboratoire pour les rendre plus efficaces à détecter les mutagènes. Les caractéristiques de ces souches sont:

- Une paroi cellulaire défectueuse, permettant la pénétration d'un grand nombre de produits chimiques dans le cytoplasme.
- Le mécanisme de réparation de l'ADN qui agit normalement chez les organismes vivants pour prévenir l'action néfaste des mutagènes, est altéré chez les souches de Ames. Ceci a pour effet d'augmenter la probabilité qu'un agent mutagène produira une mutation qui s'exprimera phénotypiquement.
- Certaines des souches servant au test de Ames possèdent un gène dit "mutator" porté par le plasmide pKM100. Le mécanisme d'action de ce gène est mal connu, mais sa présence chez une souche augmente la sensibilité de cette souche envers les mutagènes.

- Il existe plusieurs classes de mutagènes divisées selon leur mécanisme d'action sur l'ADN conduisant à une mutation. Les souches de Ames ont été développées de façon à ce que chaque souche réponde à un agent mutagène appartenant à l'une des catégories de mutagènes. Aussi, la souche TA98 est sensible aux agents provoquant une mutation "frameshift" et la souche TA100 répond aux agents qui agissent par "substitution de base".
- Les mutations histidines sont introduites à des sites dits "hot spot" du chromosome. Ces sites sont très sensibles à l'effet de mutagènes.
- Les mutations chez toutes les souches de Ames affectent les bases cytosine ou guanine (C-G). Ainsi le site mutant de TA100 est C-C-C, celui de TA97 et TA1537 est C-C-C-C-C-C et celui de TA98 et C-G-C-G-C-G-C-G. Récemment une nouvelle souche a été développée pour élargir l'éventail de réponse positive. La souche TA102 (Levin et al., 1982) dont la mutation affecte les bases adénine thymine (A-T) porte la mutation "frameshift" (A-T-A-T-A-T-A-T-A-T).

  Effectivement, Maron et Ames (1983) suggèrent de réaliser le test avec les souches TA97, TA98, TA100 et TA102.

6.2.3.2.2 Matériel requis

Pour le matériel, nous référons le lecteur à l'annexe 5 qui reproduit une lettre que Ames expédie à chaque chercheur qui lui fait la demande de souches.

6.2.3.2.3 Méthode

Chacune des quatre souches est inoculée dans du milieu Oxoid No.2 (BBL) (il est essentiel d'utiliser ce milieu) et inoculée à 37 °C avec agitation (240 rpm) pour la nuit. Ces cultures peuvent servir directement, sans autre traitement, à inoculer les milieux recevant la substance à tester.

Les boîtes de Pétri contiennent 18 mL d'un milieu minimal solide (la composition du milieu est au choix). Nous suggérons le milieu suivant: en g/l: NH_4SO_4, 1; Na_2HPO_4, 6; KH_2PO_4, 3; $FeSO_4$, 0.005; $MgCl_2$, 0.05; $MnCl_2$, 0.05; $CaCl_2$, 0.01; Agar, 20; Glucose, 10; H_20, 1000 mL. Les boîtes contenant le milieu sont entreposées à la température ambiante plusieurs heures avant d'effectuer le test. La veille de l'expérience, il faut préparer une série de tubes jetables en plastique (tubes "Falcon" stériles jetables de 17 X 1000 mm) en les déballant pour s'assurer qu'au moment de l'expérience il ne reste aucune trace d'oxyde d'éthylène.

Le jour de l'expérience, chacun des tubes recevra 2 mL d'un milieu constitué de 0,85 pour cent NaCl, 0,6 pour cent Bacto-Agar (Détroit, Michigan) et 0,05 mM L-histidine/0,05 mM biotine. Ces tubes sont déposés dans un bain-marie à 43 °C exact (plus haut tuerait les cellules - plus bas figerait l'agar). À ces tubes sont ensuite ajoutés dans l'ordre 0,1 mL de la culture bactérienne, 0,5 mL du mélange S-9 maintenu sur glace et 0,1 mL d'une solution du produit à tester - dissous dans le DMSO (dimethyl sulfoxide) à la concentration désirée. En général, on utilise au moins cinq concentrations différentes du produit entre 0,1 ug et 1 mg par boîte de Pétri, de façon à pouvoir tracer une courbe dose-réponse. Aussi, on doit faire l'essai en triplicata pour chaque concentration du produit, en l'absence de l'extrait cellulaire S-9 et en présence de deux concentrations distinctes de cette préparation.

Le mélange S-9 (à deux concentrations d'extrait de foie de rat) contient: 0,8 mM $MgCl_2$; 33 mM KCl; 5 mM glucose-6-phosphate; 4 mM NADP; 100 mM tampon phosphate, pH 7,4; 0,04 mL/mL ou 0,08 mL/mL de la fraction S-9. La fraction S-9 peut être préparée en laboratoire ou obtenue commercialement (Bionetic, Kensington, Maryland).

Au moment d'effectuer le test, il est important de faire des contrôles positifs avec des mutagènes connus et d'inoculer (pour chaque souche) des boîtes de Pétri qui ne contiennent pas de mutagène ou de produit à tester. Ces dernières cultures permettent de déterminer le taux de mutation inverse spontanée de chaque souche. Les contrôles positifs suggérés sont en ug/plaque la daunomysine, 6; l'azidure de sodium, 1,5; la mitomycine, 0,5; le 2-amifluorene, 10. Le nombre de mutants inverses pour chaque souche à ces concentrations de standards mutagènes est rapporté dans Maron et Ames (1983). Enfin, il est essentiel de suivre la procédure décrite par Maron et Ames (Annexe 6) pour confirmer le génotype des souches, en particulier pour la mutation (rfa), pour la mutation uvr B, et de confirmer la présence des plasmides pKM101 et pAQ1.

6.2.3.2.4 Lecture des résultats

Pour l'interprétation des résultats, il faut d'abord tracer une courbe dose-réponse (concentration du mutagène par plaque en fonction du nombre de mutants inverses). Le nombre de mutants inverses est la valeur corrigée après soustraction du nombre de mutants inverses spontanés. L'activité d'un agent peut alors être exprimé en terme de nombre de mutants inverses/plaques/ug de produit, en faisant la lecture sur la partie droite de la courbe dose-réponse. Souvent, dans la littérature, on admet

que pour être considéré mutagène, un composé doit donner une courbe dose-réponse qui a une portion droite et provoquer une fréquence de mutation inverse d'au moins le double de la fréquence de mutation inverse spontanée. Il n'existe cependant aucune base scientifique pour cette assertion. C'est pourquoi, dans un espoir de présenter les résultats d'une façon plus propice à une évaluation statistique, McCann et al., 1984 et Bernstein et al., 1982 ont introduit la notion de la D100. Cette valeur est égale à la dose requise pour qu'un mutagène induise 100 mutants inverses de plus que le taux de mutation inverse spontanée. Elle se calcule en faisant le rapport de 100 sur la pente initiale de la courbe dose-réponse. La notion de la D100 n'a cependant pas encore été utilisée de façon constante dans la littérature.

Retenons également, pour l'interprétation des résultats du test de Ames, que les souches de Salmonella ne peuvent pas détecter certaines classes de composés incluant les composés "azo", les antimétabolites d'acides nucléiques; les carbonyles et thiocarbonyles; les composés organo-halogènes, les stéroïdes et les promoteurs qui ne sont pas inducteurs ainsi que les cancérogènes inorganiques.

6.2.3.2.5 Variations du test de Ames

Le test de Ames peut être effectué et interprété selon la méthode de fluctuation en cultivant les cellules exposées à l'agent mutagène en milieu liquide. La compagnie Biosystem (Suovaniemi et al, 1984) a utilisé le principe du test de fluctuation pour développer le test appelé "mutascreen". Dans les deux cas, pour des échantillons d'eau, le test est d'application plus facile que le test de Ames original mais l'utilisation de ces tests pourrait conduire à des résultats difficiles à interpréter et incomparables avec ceux déjà décrits dans la littérature. Il n'est donc pas à recommander d'utiliser ces variantes du test de Ames.

6.2.3.3 Test de mutagénicité, mutation au locus HGPRT avec des cellules V79 de hamster chinois (Arlett, 1977)

Souches

Contrairement au test de Ames, ces tests utilisant des lignées cellulaires ne sont pas standardisés. Nous suggérons ici une procédure qui pourrait être appliquée facilement dans n'importe quel laboratoire.

6.2.3.3.1 Matériel requis

Appareils
- -laminaire
- -cylindre de 5 pour cent CO_2 dans l'air
- -centrifugeuse de table
- -incubateur à CO_2, modèle LEEC à injection
- -congélateur Union Carbide BF6. Biological Freezer
- -compteur Coulter ou Hémacymètre (Hawksley) muni d'une grille améliorée Newbauer (BS748), profondeur (0,1 mm, 1/400 mm^2)
- -microscope

Produits
- -8-azaguanine (Sigma)
- -6-thioguanine (Sigma)
- -trypsine (Difco)
- -diméthyl sulfoxide

6.2.3.3.2 Méthode

6.2.3.3.2.1 Milieu de culture complet

La composition du milieu complet est la suivante:

milieu minimal de Eagle avec sels de Earle, concentré 10 X, dépourvu de glutamine et de carbonate de sodium (Flow laboratories)(40 mL)

sérum fétal de veau (45 mL)

bicarbonate de sodium 7,5 pour cent (12,8 mL)

péniciline, 5000 u.i./mL (9,5 mL)

streptomycine, 5000 ug/mL (4,5 mL)

glutamine, 200 mM. (4,0 mL)

6.2.3.3.2.2 Milieu de suspension pour traitement

Tampon phosphate salin (Dulbecco A)

6.2.3.3.2.3 Cultures cellulaires

Les cultures sont maintenues par transferts successifs à raison de deux passages par semaine. Les cultures sont rincées (trypsine 0,025 pour cent), puis trypsinisées. Les cellules sont centrifugées, dénombrées et remises en suspension dans le milieu de culture complet. L'état des cellules est vérifié afin de détecter toute trace de contamination par des mycoplasmes. Les bouteilles de cultures ensemencées sont incubées à 37 °C sous une atmosphère de 5 pour cent de CO_2 dans l'air.

6.2.3.3.2.4 Conservation des cultures par congélation

Lorsque la culture cellulaire atteint une phase stationnaire de croissance elle est trypsinisée. Les cellules sont re-suspendues

dans le milieu de culture complet, comptées, centrifugées et re-suspendues dans le milieu de culture complet auquel on a ajouté 10 pour cent de DMSO, à raison de 3×10^6 cellules/mL. Des fractions de 1 mL de la suspension sont placées dans des ampoules, mises au congélateur et finalement placées dans l'azote liquide.

6.2.3.3.2.5 Tests de toxicité

Les tests de toxicité servent à établir les limites à l'intérieur desquelles doivent être menés les tests de mutagénicité. Des doses qui laissent 100 pour cent et 0,1 pour cent de survivants peuvent être retenues comme doses limites.

Un nombre connu de cellules est trypsinisé et ensemencé dans un milieu de culture complet. Après une période d'incubation de quatre heures le milieu est retiré et remplacé par une solution du produit testé. Après le traitement, la solution est retirée et les cellules sont rincées avec une solution tampon (tampon phosphate saline pH 7,0, 0,1 M) et rincées de nouveau avec le milieu complet. Du milieu complet est rajouté aux cultures et celles-ci incubées à 37 °C - 5 pour cent CO_2/air. Après une période d'incubation on dénombre les colonies qui ont survécu au traitement (colonies visibles à l'oeil nu) pour chacune des doses.

6.2.3.3.2.6 Test de mutagénicité

Un nombre connu de cellules est ensemencé dans le milieu de culture complet. Elles sont incubées pour une courte période de temps après laquelle le milieu est retiré et remplacé par une solution du produit testé. La concentration est établie d'après les résultats du test de toxicité. Après le traitement la solution est retirée et les cellules sont rincées une

première fois avec la solution tampon phosphate et une seconde fois avec le milieu de culture complet. Un milieu complet est ajouté aux cultures et celles-ci sont incubées à 37 °C, le temps nécessaire pour que les mutations s'expriment dans le phénotype. Il est préférable d'ajouter l'agent sélectif après plusieurs temps d'expressions différents (0,1,2,3 jours). L'agent sélectif (azaguanine 30 ug/ml ou thioguanine 30 ug/ml) est ensuite ajouté directement dans le milieu de culture et après une deuxième période d'incubation suffisante, environ 15 jours, on dénombre les clones survivants.

Une procédure semblable est suivie pour évaluer le taux de survie des cellules pendant le traitement à l'agent mutagène. Pour chaque dose de l'agent à tester une suspension traitée est inoculée dans un milieu complet ne contenant pas l'agent de sélection. Après incubation adéquate à 37 °C, les colonies présentes sont dénombrées.

Des contrôles négatifs et positifs sont menés selon le même protocole. Le contrôle négatif effectué sans le produit, permet d'évaluer le nombre de mutations spontanées. Le contrôle positif effectué avec un mutagène connu permet de vérifier l'efficacité du système.

Le système d'activation (S-9) utilisé pour le test de Ames peut être ajouté au milieu de culture.

6.2.3.3.2.7 Lecture des résultats

Le taux de mutation est évalué à partir du nombre de mutants induits et du nombre de survivants.

Taux de mutation pour chaque dose	=	nombre de clones mutants/nombre de cellules survivantes
Nombre de clones mutants induits	=	nombre total de mutants - mutants spontanés (contrôle négatif)
Nombre de survivants pour chaque dose	=	fraction des cellules qui ont survécu au traitement, en l'absence d'agent sélectif X nombre de cellules ensemencées avant le traitement.

On retient pour le calcul du taux de mutation de chaque dose le temps d'expression qui engendre un nombre maximal de mutants. Pour qu'un produit soit considéré comme mutagène on doit obtenir une courbe dose-réponse droite.

6.2.3.4 Test de transformation cellulaire in vitro (Style, 1977, 1981)

6.2.3.4.1 Matériel requis

-compteur de particules

-bouteilles "roller" (Belco)

-incubateur enrichi au CO_2

-centrifugeuse

-microscope à inversion

6.2.3.4.2. Souches

Comme pour le test précédent il n'existe pas de procédure standardisées. Nous suggérons ici la méthode proposée par Style (1977).

cellules BHK-21/CL13 (Baby hamster kidney cells)

cellules BHK-21/CL13 (PyY) pour contrôle

disponibles chez Flow Laboratories et Gibco-Biocult

6.2.3.4.3 Méthode

6.2.3.4.3.1 Milieu de culture

Milieu de Eagle (Dubelco), contenant 10 pour cent de sérum de veau, 200 ug/ml de peniciline, 200 ug/mL de streptomycine, 200 ug/mL de kanamycine et tamponé avec 0,44 pour cent de bicarbonate de sodium à un pH de 7,3.

6.2.3.4.3.2 Cultures cellulaires

Les cellules sont incubées sur un appareil "roller" à 37 °C dans 200 mL de milieu de culture complet. Lorsque les cultures sont confluentes, les cellules sont trypsinisées (trypsine, solution à 0,25 pour cent dans la saline) et remises en suspension dans le milieu complet. Elles sont réensemencées à raison de 10 mL de suspension par 190 mL de milieu complet. Les cultures sont remises à l'incubateur jusqu'à ce qu'elles atteignent 90 pour cent de confluence pour les tests de transformation ou 100 pour cent pour les sous cultures suivantes. Les cellules ne peuvent être maintenues pour plus de 10 passages successifs sur le milieu de culture. De nouvelles cultures doivent être rétablies à partir des stocks congelés.

6.2.3.4.3.3 Congélation des cultures

Les cultures sont incubées jusqu'à ce qu'elles atteignent 90 pour cent de confluence. Le milieu est alors retiré et les cellules trypsinisées. Elles sont remises en suspension dans 20 mL du milieu complet et aspirées avec une pipette dans des bouteilles stériles, centrifugées et finalement re-suspendues dans 12 mL du milieu de congélation (milieu Eagle modifié par Dulbecco, avec 10 pour cent de sérum de veau et 10 pour cent de glycérole). Des fractions de 1,5 mL de la suspension sont transférées dans des ampoules de polypropylène déposées au congélateur à -20 °C et finalement entreposées dans l'azote liquide.

6.2.3.4.3.4 Test de transformation

Les cultures sont trypsinisées et remises en suspension (10^6 cellules/mL) dans du milieu tamponné à l'HEPES. Des fractions de 1 mL de la suspension sont placées dans des bouteilles McCartney stériles et 10 uL de mélange S-9 et 10 uL du produit testé en solution sont ajoutés à chaque bouteille. Celles-ci sont placées dans un incubateur orbital. Après une période d'incubation de quelques heures, les cellules sont centrifugées et re-suspendues dans 10 mL de milieu complet auquel on ajoute de l'agar liquéfié (0,625 mL d'agar noble 5 pour cent difco), la suspension est agitée fortement et versée sur un plat de Pétri. Après solidification du milieu les plats sont transférés dans un incubateur à 37 °C sous une atmosphère de 5 pour cent CO_2/air pour une période de 19 à 21 jours. Le test est répété pour plusieurs concentrations différentes du produit.

6.2.3.4.3.5 Test de toxicité

Les tests de toxicité visent à évaluer la concentration du produit qui réduit la croissance cellulaire de 50 pour cent (LC50). 50 uL de la suspension de cellules traitées sont prélevées, pour chaque concentration du produit testé, juste avant l'ajout de l'agar et dispersées dans un plat de Pétri contenant 5 mL du milieu complet. Les cultures sont placées à l'incubateur jusqu'à ce que les colonies soient visibles à l'oeil nu (six à neuf jours). Les cultures sont alors lavées avec une solution de sels de Hank (Hank's balanced salt solution), puis fixées avec un mélange eau-méethanol (1:1) et colorées à l'hématoxyline. Le taux de survie est exprimé en pourcentage de survivants exposés aux produits par rapport aux survivants non exposés (contrôle négatif). Les résultats sont reportés sur un graphique pour déterminer la concentration létale 50 pour cent.

6.2.3.4.3.6 Quantification de la transformation

Les cultures sont examinées au microscope à inversion avec un objectif de 20 x. Les colonies transformées (plus grandes que 500 um) à la concentration létale 50 pour cent sont dénombrées. Un produit est considéré actif lorsqu'au LC50 il induit la formation d'au moins 5 x plus de cellules transformées que le nombre de cellules transformées spontanées. Bien qu'acceptée dans la littérature, cette valeur de "5" n'a cependant pas de fondement statistique et doit être utilisée avec précaution.

6.2.3.4.3.7 Témoins de cellules transformées

Les cellules BHK-21/CL13 (PyY) (polyoma-transformed) sont ensemencées à raison de 10^3 cellules par plat de Pétri et incubées sur de l'agar semi-solide. Si les colonies ne se forment pas, l'agar utilisé n'est pas valable pour les tests de transformation.

6.2.4 Quantité de matériel requis pour les tests de toxicité

Le tableau 6-1 fournit les quantités approximatives de matériel (eau et résidus) requis pour effectuer les tests de mutagénicité bactérienne et cellulaire ainsi que le test de transformation cellulaire.

TABLEAU 6.1

Volume d'eau requis pour effectuer

les tests de génotoxicité in vitro

Test	Nombre de Pétri	Dose mg/Pétri	Résidu total requis (mg)	Volume d'eau* (litre)
Ames	108[a]	10,1,0.1	400	133
Mutation cellulaire	18[b]	1,0.1,0.01	20	6,7
Transformation cellulaire	30[c]	1,0.1,0.01	34	11

* volume requis assumant une concentration de 3 mg de solide par litre d'eau

a) 4 souches, 3 doses en triplicata, avec ou sans S9 à 2 concentrations

b) 1 souche, 3 doses, 3 Pétri par dose avec ou sans S9

c) 1 souche, 3 doses, 5 Pétri par dose avec ou sans S9.

Les résidus solides obtenus par chromatographie sur résine XAD sont souvent inférieurs à 1 mg/l, il faudra donc prévoir extraire des quantités d'eau bien supérieures à celles figurant au tableau 4-1.

6.2.5 Toxicité In vivo

Les études de toxicité in vivo sont de longue durée et exigent à la fois un espace physique permettant un traitement convenable des animaux et l'expertise sur place de vétérinaires spécialisés en médecine des animaux de laboratoire. Pour beaucoup de compagnies pharmaceutiques, bien que très couteux (environ 300 000 $) ces tests sont effectués sous contrat par des laboratoires spécialisés. Nous recommandons également cette alternative. Cependant, nous donnons quand même en annexe 7 la prodécure générale recommandée par le Comité d'experts du NRC(1982) pour les tests aigus, subaigus et chroniques qui sont requis dans le cas de mélanges complexes. Cette annexe décrit en détail les animaux à utiliser, les doses à administrer et les analyses à effectuer.

Pour la réalisation des essais in vivo, nous recommandons une méthode de concentration moins sélective que la résine XAD. La lyophilisation ou de préférence l'osmose inverse seraient des méthodes convenables. La raison du rejet des résines XAD est que les tests réalisés chez les animaux nécessitent des concentrations moins grandes des solides présents dans l'eau et aussi que les ions inorganiques sont moins susceptibles de présenter des effets toxiques chez les animaux. Par contre, il est nécessaire d'administrer à l'animal un concentrat où sont présents chacun des constituants du mélange original afin de s'assurer de l'absence de synergisme néfaste pour l'animal entre certains des polluants de l'eau.

Chapitre 7

SECTEURS DE RECHERCHE À DÉVELOPPER

Le protocole proposé au chapitre 6 se base nécessairement sur des données scientifiques dont un grand nombre reste encore imprécis et souvent contradictoire. Il existe à ce jour, plusieurs secteurs de recherche à développer dans le domaine de la qualité des eaux contaminées par un mélange complexe de micropolluants et qui sont destinées à une consommation humaine.

Tout au long du rapport, nous avons soulevé, dans la mesure du possible, les points précis qui restent à développer dans chacun des cas particuliers que nous discutions. Nous résumerons dans ce chapitre, les aspects les plus importants pour lesquels les données doivent être confirmées ou pour lesquels il faut trouver une réponse.

La première des questions d'importance à soulever est de connaître les moyens d'interpréter les résultats positifs dans les cas de test de mutagénicité in vitro réalisés avec des mélanges complexes de composants. En premier lieu, à ce jour, il est impossible, en se basant sur les données de la littérature, d'attribuer une réponse positive à un élément précis du mélange ou à un effet additif ou synergique résultant de l'action combinée de plusieurs des constituants du mélange. En effet, nos connaissances actuelles sur la possibilité de synergisme entre différents éléments d'un

mélange complexe de micropolluants sont très limitées. Citons l'exemple de Nellor et al., 1981 qui suggère que l'effet toxique observé dans leur étude d'une eau polluée résulterait d'un effet synergique entre les différents constituants de cette eau. Cependant, à ce jour toute suggestion semblable n'est que spéculation. De plus, nos connaissances actuelles, ne nous permettent pas d'établir une corrélation entre les activités mutagènes in vitro de mélanges complexes et les activités cancérogènes chez les animaux. Il existe à ce sujet quelques études qui semblent suggérer l'absence d'une corrélation directe, mais ces études sont éparses, très peu nombreuses et nécessitent d'être confirmées.

Autre point à considérer, dans le cas d'analyse de la toxicité de mélange complexe de micropolluants de l'eau, les méthodes d'extraction contribuent pour une large part aux types de résultats obtenus. Il est en effet important que la méthode de concentration retenue puisse fournir des concentrats dont la composition chimique soit la plus représentative de la matière totale présente dans l'échantillon original. Il faut toutefois souligner que pour la plupart des tests de génotoxicité in vitro il est nécessaire de fractionner les concentrats pour éliminer les constituants toxiques interférant avec les résultats du test; mentionnons notamment les ions inorganiques. Au chapitre des méthodes de fractionnement telles les filtrations moléculaires, les résines échangeuses d'ions ou les résines types XAD, nous n'avons que très peu d'information à ce jour quant à leur rendement pour extraire sélectivement les micropolluants toxiques. Il reste donc à confirmer l'utilité de ces méthodes de fractionnement pour concentrer une partie de la matière organique présente dans l'échantillon d'eau original.

Malgré le problème apparent de la résine XAD, celle-ci demeure quand même la solution de choix pour concentrer et fractionner les échantillons d'eau en vue d'études toxicologiques préliminaires, en raison de son coût, de sa facilité d'application et de ses possibilités de comparaison des résultats avec la littérature.

Nous avons également suggéré de désinfecter l'eau de la ville de Mecier avant d'effectuer le test de toxicité afin de s'assurer qu'une désinfection éventuelle ne générera pas de mutagènes en quantité plus importante que dans les autres villes canadiennes. En effet, il peut arriver qu'une eau plus chargée en micropolluants puisse, sous l'action de désinfectants (chlore ou ozone) augmenter son activité mutagénique, mais nous n'avons à ce sujet, aucune information pertinente.

Du côté de la toxicité animale de mélanges complexes, il est évident qu'un grand nombre de questions restent sans réponse. En premier lieu, le choix des espèces à retenir, les doses à administrer et le modèle mathématique le plus adéquat pour l'interprétation des résultats. Ce type d'information nécessite toutefois de longues années de recherches, et l'urgence de la situation de la ville de Mercier ne nous permet pas d'attendre l'obtention de résultats adéquats à cet égard, nous devons plutôt nous fier sur le bon sens dans l'interprétation des données scientifiques actuelles.

Enfin, est-ce que l'eau traitée pourrait servir à des fins agricoles? Notre recherche bibliographique ne nous a pas permis de trouver d'études tentant de répondre directement à une question semblable. De plus, il n'existe pas de norme, à notre connaissance pour la qualité de l'eau utilisée pour drainer les terres agricoles. On pourrait croire a priori, que l'eau contaminée par des micropolluants pourrait servir à des fins agricoles sans mettre en danger la population.

De fait, si l'eau susceptible de renfermer des micropolluants n'est pas consommée directement par l'homme, le danger d'exposition est certainement moins grand. Il existe cependant plusieurs aspects encore inconnus. On ignore entre autres si les plantes ayant crû sur des terres irriguées par des eaux polluées puissent accumuler certains des micropolluants présents. Il est douteux que l'eau traitée de la ville de Mercier, renfermant des quantités infimes de micropolluants puisse avoir un effet direct sur la croissance des plantes. Cependant, la bioconcentration des micropolluants dans les plantes ayant crû sur les terres irriguées par une eau polluée pourrait présenter un danger pour la population qui consomme ces plantes. Ce chapitre mérite certainement une attention particulière puisqu'il existe des exemples (Iwata et Gunther, 1976; Mrozeck et al, 1982) démontrant la capacité de certaines plantes à accumuler des micropolluants. On ignore cependant l'effet de la composition du sol sur la rétention ou la translocation des micropolluants vers les plantes. Ainsi, Weber (1972 et 1978) a démontré que la migration des micropolluants dans les sols est variable selon la composition du sol. Il reste à savoir dans quelle mesure le sol de la ville de Mercier pourrait affecter le transfert des micropolluants vers les plantes qu'on y cultive.

Chapitre 8

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Notre étude avait pour but de recommander au ministère de l'Environnement des méthodes de choix pour s'assurer de l'acceptabilité de l'eau traitée de la ville de Mercier pour consommation humaine.

Dans un premier temps, nous avons répertorié les cas semblables à ceux de la ville de Mercier en vue de trouver des exemples de décisions prises, sur lesquels le Ministère aurait pu fonder ses propres décisions. Malheureusement, il n'en existe pas à ce jour qui se soit réglé de façon satisfaisante.

Il existe deux approches pour régler un cas comme celui de la ville de Mercier. La première consisterait à utiliser les techniques de pointe pour détecter et quantifier les micropolluants qui contaminent l'eau afin de s'assurer que leur concentration respective est en dessous du seuil de toxicité. C'est la seconde approche qui est retenue par les Comités d'experts de l'EPA s'étant penchés sur le problème des eaux susceptibles d'être contaminées par des mélanges complexes de micropolluants, notamment les eaux envers les animaux et à extrapoler les résultats pour l'homme.

Cependant, à cause de la complexité du mélange et des coûts exorbitants que nécessitent les tests de longue durée chez les animaux, nous avons proposé comme ce fut fait pour les eaux recyclées par le "National Research Council" des États-Unis (1982), d'effectuer d'abord une batterie de tests de toxicité rapides pour s'assurer que le traitement élimine la plus grande partie des microtoxiques présents dans l'eau brute. Pour ces études préliminaires qui peuvent également servir à faire un suivi de l'évolution du traitement des eaux de la ville de Mercier, nous suggérons de faire appel aux tests de toxicité in vitro.

Il existe un très grand nombre de tests de toxicité in vitro. Nous avons répertorié des exemples de chaque catégorie. On peut distinguer entre les tests établis pour détecter les composés cytotoxiques et les composés génotoxiques (mutagènes). La détermination des activités cytotoxiques in vitro n'est cependant pas essentielle car des tests de courte durée chez les animaux peuvent nous permettre de répondre rapidement à cette question. Les tests de cancérogénicité chez les animaux sont cependant très laborieux et coûteux. Puisqu'il existe une corrélation entre la mutagénicité d'un composé et son potentiel cancérogène, nous avons recommandé d'établir un protocole faisant appel à des tests de génotoxicité in vitro.

Le rapport présente des exemples de chacun des types de test de génotoxicité répertoriés dans la littérature. Nous les avons évalués en fonction de leur valeur prédictive pour déceler des cancérogènes, de leur popularité dans les autres laboratoires et de leur emploi dans des analyses de toxicité d'échantillon d'eau potable contaminée par des micropolluants.

Le rapport présente une discussion sur les modèles d'extrapolation à l'humain des résultats d'analyse de toxicité. L'extrapolation de l'animal à l'homme est généralement acceptée par les organismes se préoccupant de la santé humaine, mais nos connaissances actuelles sont trop limitées pour nous permettre d'extrapoler à l'homme les résultats de tests de toxicité in vitro. Toutefois, les résultats de ces dernières analyses pourraient certainement nous fournir des renseignements utiles, entre autres sur la progression de la décontamination de la nappe souterraine de la ville de Mercier et sur l'intérêt de poursuivre les études de toxicité chez les animaux pour s'assurer de l'acceptabilité de l'eau traitée pour consommation humaine. En effet, la détection d'une forte activité mutagène par les tests in vitro permettrait au Ministère de ne pas entreprendre inutilement des études de toxicité de longue durée chez les animaux.

De toute manière, pour permettre une extrapolation des résultats il est nécessaire de pouvoir concentrer les constituants solides de l'eau. Nous avons également répertorié les méthodes de concentration utiles dans ce cas et les avons évaluées en fonction de leur potentiel d'application pour l'analyse des eaux de la ville de Mercier.

Enfin, nous avons suggéré un protocole, fondé sur l'évaluation que nous avons faite des tests de toxicité et des méthodes de concentration ainsi que sur le protocole recommandé par l'EPA pour l'évaluation de l'acceptabilité pour consommation humaine d'eaux contaminées par des micropolluants.

Dans un premier temps, nous recommandons de concentrer les micropolluants susceptibles d'être mutagènes en les fractionnant par chromatographie sur résine XAD. Cette méthode a l'avantage d'être simple, peu coûteuse, d'éliminer les ions inorganiques qui interfèrent souvent dans les tests de toxicité in vitro et enfin d'avoir déjà servi pour la préparation de concentrats d'eau potable de villes canadiennes qui ont été analysés pour la présence de mutagènes. Cette méthode ne permet de concentrer qu'environ cinq pour cent de la matière organique présente, et ne devrait pas être utilisée pour la préparation de concentrats devant servir aux tests de toxicité chez les animaux.

De toute évidence, le test de choix pour évaluer la génotoxicité in vitro est le test de Ames qui a déjà été utilisé pour l'évaluation de l'activité mutagène d'eau traitée de villes canadiennes et d'autres pays.

Nous avons décrit en détail ce test qui à ce jour est celui qui reçoit le plus de crédibilité quant à sa valeur prédictive pour détecter les cancérogènes. Toutefois, dans un deuxième temps, à cause de l'incapacité de chaque test in vitro à détecter tous les cancérogènes et à cause de la complexité du mélange à analyser (il est impossible d'établir une corrélation entre l'activité mutagénique in vitro d'un mélange complexe du micropolluant et son activité oncogène in vivo) nous suggérons aussi dans le cas de la ville de Mercier de réaliser des essais de génotoxicité in vitro employant des cellules animales (tests de mutagénicité et transformation cellulaire). Enfin, si cette batterie de tests in vitro révélait l'absence de mutagènes détectables, il faudrait en dernier essor effectuer des tests de toxicité chez les animaux. Ces tests devraient alors être effectués avec des concentrats préparés par lyophilisation ou osmose inverse et l'extrapolation des résultats chez l'homme devrait être effectuée selon le modèle de (Crumps modifié par l'EPA).

Enfin, si le Ministère jugeait à propos d'utiliser l'eau traitée de la ville de Mercier pour irriguer des terres agricoles, nous avons présenté un certain nombre de suggestions quant aux aspects de recherche qu'il reste à développer. Il faudra entre autres vérifier si le sol de la région retient les micropolluants ou s'il permet leur translocation vers les plantes. À ce sujet, il a déjà été démontré que les plantes peuvent accumuler certains polluants organiques dont les BPC et il faudrait à cet effet s'assurer que ces plantes puissent servir pour consommation humaine.

Malheureusement, à notre connaissance, il n'existe pas de normes ni au Québec ni ailleurs concernant la qualité des eaux pouvant servir à des fins d'irrigation.

RÉFÉRENCES

Anderson, E.L. and the Carcinogen Assessment Group of the U.S. Environmental Protection Agency. 1983. "Quantitative Approaches in use to assess cancer risk", Risk Analysis, 3(4): 277-295.

Anderson, M., M.L. Binderup, P. Kiel et H. Larsen. 1979. "Evaluation of the Ames test", Ugeskr. Laeg., 14: 305-307.

Arlette, C.F. 1977. Mutagenecity testing with V79 Chinese hamster cells, In "Handbook of Mutagenicity test procedures", (B.J. Kilbey et al., Eds.), Elsevier Scientific Pu. Ce., Amsterdam, pp 175-192.

Armitage, P. et I. Allen. 1950. "Methods of estimating the LD50 in quantal response data", J. Hyg. (London), 48: 298-322.

Baird, R., J. Gute, C. Jacks, R. Jenkins, L. Neisess, B. Scheybeler, R. Van Sluis et W. Yanko. 1980. Health effects of water reuse: a combination of toxicological and chemical methods for assessment, In "Water chlorination: Environmental Impact ans Health Effects, vol. 3" (R.L. Jolley, W.A. Brungs et R.B. Cumming, Eds.) Ann Arbor science pu. co., Ann Arbor, Michigan. pp 925-935.

Baird, R.B., J.P. Gute, C.A. Jacks, L.B. Neisess, M.H. Nellor, J.R., Smyth and A.S. Walker. 1984. Gas chromatography-negative ion chemical-ionization mass spectometry and Ames mutagenicity assays of resin concentrates of GAC effluents from an advanced waste water treatment facility, Presented at the 188th american chemical society meeting, Philadelphie, Aug., 1984. Abstracts of papers. 188.

Baker, R.A. 1969. "Trace organic contaminant concentration by freezing - -III. ice washing", Water res. 3: 717-730.

Baker, R.A. 1970. "Trace organic contaminants concentration by freezing -- IV. ionic effects", Water res. 4: 559-573.

Bartsch, H., C. Malaveille, A.M. Camus, G. Martel-Planche, G. Brun, A. Hautefeuille, N. Sabadie, A. Barbin, T. Kuroki, C. Devron, C. Piccoli et R. Montesano. 1980. "Validation and comparative studies on 180 chemicals with S. typhimurium strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems", Mutation res. 76: 1-50.

Bartsch, H., L. Tomatis et C. Malaveille. 1982. "Mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals", Regulatory Toxicol. Pharmacol. 2: 94-105.

Benoit, F.M., G.L. LeBel et D.T. Williams. 1979. "The determination of polyciclic aromatic hydrocarbons at the ng/L level in Ottawa tap water", Intern. J. Environ. Anal. Chem. 6: 277-287.

Bernstein, L., J. Kaldor, J. McCann et M.C. Pike. 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test", Mutation res. 97: 267-281.

Bieri, R.N., M.K. Cueman, R.J. Huggett, W. MacIntyre, P. Shou, C.W. Su et G. Ho. 1979. Investigation of organic pollutants in Chesapeake Bay: Report °1, Grant R806012010. U.S. Environmental Protection Agency. Annapolis.

Bigwood, E.J. 1973. "The acceptable daily intake of food additives", CRC. Critical Rev. Toxicol. 2: 41-93.

Blaise, C.. 1984. Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents, Thèse de doctorat publiée par Environnement Canada. 172 p.

Bridges, B.A., E. Zeiger et D. MacGregor. 1981. Summary report on the performance of Bacterial mutation assays, In "Progress in mutation research, vol. 1: Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Report of the International collaborative Program." (F.J. de Serres et J. Ashby. eds.) Elsevier/North Holland inc. Amsterdam. pp 49-67.

Brusick,D.. 1983. "Mutagenicity and carcinogenicity correlations between bacteria and rodents", Ann. New York Acas. Sci. 407: 164-176.

Brusick, D. et A. Auletta. 1985. "Developmental status of bioassays in genetic toxicology: A report of phase II of the U.S. Environmental Protection Agency, Gene-Tox Program", Mutation res. 153: 1-10.

Brusick, D.J., V.F. Simon, H.S. Rosenkvanz, V.A. Ray et R. Stafford. 1980. An evaluation of the Escherichia coli WP_2uvrA reverse mutation assay, Mutation res. 76: 169-190.

Bulich, A.A.. 1979. "Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environment", In "Aquatic Toxicology", (Marking L.L. and R.A. Kimerle, eds) American society for testing and materials, ASTM 667: 98-106.

Bull, R.J.. 1982. "Experimental methods for evaluating the health risks associated with organic chemicals in drinking water", Toxicol. Environm. Chem. 6: 1-17.

Bull, R.J.. 1984. Toxicology of natural and man-made toxicant in drinking water, EPA. report PB84-246255.

Cabridenc, R. et A. Sidka. 1979. Analysis of the micropollutants of water, Extraction of Organic micropollutants from water for the purpose of performing biological assays, Presented at the European Symposium on Analysis of Organic Micropollutants of water, Berlin, Dec. 11-13. 1979, EPA translation No. TR80-0252, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Calabrese, E.J.. 1978. Methodological Approaches to Deriving Environmental and Occupational Health Standards, John Wiley and son, New York. 402 p.

Chappel, W.R., C.C. Salomon, H.F Waltons et W.L. Weston. 1979. Health effects of consumption of renovated water, chemistry and cytotoxicity, EPA, report PB - 295 674.

Cheh, A.M., J. Skochdopole, C. Heilig, P.M. Koski et L. Cole. 1980. Destruction of direct-acting mutagens in drinking water by nucleophiles: Implication for mutagen identification and mutagen elimination from drinking water, In "Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects. Vol. 3." (R. L. Jolley, W.A. Brungs et R.B. Cumming, Eds.) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp 803-815.

Chernoff, N., E. Rogers, B. Carber, R. Kavlock et E. Gray. 1979. "Fetotoxic potential of municipal drinking water in the mouse", Teratology, 19: 165-169.

Chriswell, C.D., R.L. Ericson, G.A. Junk, K.W. Lee, J.S. Fritz et H.S. Svec. 1977. "Comparison of macroreticular resin and activated carbon as sorbents", J. Am. Water Works Ass. 69: 669-674.

Conseil canadien sur les soins des animaux. 1973. Care of experimental animals - a guide for Canada.

Crump, K.S., D.G. Hoel, C.H. Langley et R. Peto. 1976. "Fundamental carcinogenic processes and their implications for low dose risk assessment", Cancer res. 36: 2973-2979.

Cumming R.B., L.R. Lewis, R.L. Jolley et C.I. Mashni. 1979. Mutagenic activity of non volatile organics derived from treated and untreated wastewater efluents, In "Progress in Waste Water Disinfection Technology", (A.D. Venosa. ed.) Proceedings of the National Symposium, sept. 18-20, 1978, U.S. Environmental Protection Agency, E.P.A., 600/9-79-018. pp. 246-252.

De Serres, F.J. et J. Ashby, (Eds.). 1981. Progress in Mutation Research, vol. 1: Evaluation of short term tests for carcinogens, Report of the International Collaborative Program, Elsevier/North Holland, New York, 827 p.

Draper, M.H.. 1979. Tests for mutagenisis from a regulatory point of view. In "Topics in Toxicology, Mutagenesis in Mammalian Systems", (Paget, G.E. ed.) University Park Press, Baltimore pp. 195-202.

Dressler, M.. 1979. "Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers", J. chromatography, 165: 167-206.

Ehrenberg, L.. 1979. Induced mutation in microorganisms: validity for estimating risk to man, In "Topics in Toxicology: Mutage nesis in Sub-Mammalian systems: status and significance", (G.E. Paget, ed.) University Park Press, Baltimore, pp. 73-88.

Environmental Protection Agency. 1977. Drinking Water and Health, National Academy of Science, Washington, D.C. PB. 269-519.

Environmental Protection Agency. 1980. Drinking Water and Health: Vol. 3, National Research Council, Washington, D.C.. ISBN-O-309-02932-5.

Environmental Protection Agency Gene Tox. cité par Brusick. 1983.

Forster, M.A. et I. Wilson. 1981. "The application of mutagenicity testing to drinking water", J. Inst. Water Engen. and scientists, 35: 259-274.

Frazer, A.C.. 1967. Heath problems in quality control: Chemical Aspects. In "Quality Control in the Food Industry, Vol. 1", (S.M. Herschdoerfer, ed.) Ac. Press. N.Y. pp. 33-50.

Freireich, E.J., E.A. Gehan, D.P. Rall, L.H. Schmidt et H.E. Skipper. 1966. "Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man", Cancer chemo ther. Rep. 50: 219-244.

Frerichs, R.R., E.M. Sloss et K. P. Satin. 1982. "Epidemiologic impact of water reuse in Los Angeles County", Environmental research 29: 109-122.

Grabow, W.O.K., W.S.G. Morgan et J.-C. Slabbert. 1985. "Essais biologiques utilisés pour évaluer la qualité des eaux recyclées en Afrique du Sud", Bull. Qualité des eaux 10: 30-36.

Greene, J.C., WE Miller, T. Shiroyama et T.E. Maloney. 1975. "Utilization of algal assays to assess the effects of municipal, industrial and agricultural waste water effluents upon phytoplankton production in the Snake River System", Water Air Soil Pollution. 4: 415-434.

Gruener, N., 1979. Biological evaluation of toxic effects of organic contaminants in concentrated recycled water, In "Proceedings of Water Reuse Symposium, Vol. 3", American Water Work Research Found. Denver, Colorado. pp. 2187-2195.

Gruener, N. et M.P. Lockwood. 1980. "Mutagenic activity in drinking water", Am. J. Path. Health, 70: 276-278.

Gustafson, R.L. et J. Paleos. 1971. Interaction responsible for the selective absorption of organics on organic surfaces, In "Organic Compounds in Aquatic Environment". (S.T. Faust et J.V. Hunter, eds.) M. Dekker Inc. N.Y. pp. 213-217.

Heddle, J.A. et W.R. Bruce. 1977. Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei and mutation in Salmonella, In "Origins of Human Cancer", (H.H. Hiat et al. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 1549-1557.

Hémon, D., P. Lazar, R. Cabridenc, A. Sdika, B. Festy, C. Gerin-Roze et I. Chouroulinkov. 1978. "Micropollution organique des eaux destinées à la consommation humaine", Rev. Épidem. et Santé Publ., 26: 441-450.

Hogan, J.M. 1959. Acute toxicity. In "Appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics", Ass. Food and Drug Officials of U.S.A. pp. 17-25.

International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. 1982. Report from Committee 1 on short term testing strategies, Mutation res. cité par Brusick (1983).

Iwata, Y. et F.A. Gunther. 1976. "Translocation of the polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 from soil into carrots under field conditions", Archi. Environ. Cont. Toxicol., 4: 44-59.

Jenssen, D. et C. Ramel. 1980. "The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test programme for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested", Mutation res., 75: 191-202.

Jolley, R.L.. 1982. Concentration of organic compounds, In "Protocol Development: Criteria and Standards for Potable Reuse and Feasible Alternatives", Report of workshop proceedings, Warrenton, Vi. EPA report PB83 - 173112 in EPA -570/9-82-005.

Jolley, R.L., S. Katz, J.E. Morchek, W.W. Pitt et W.T. Rainey. 1975. "Analysing organics in dilue aqueous solution", Chem. Tech, 5:312-318.

Jonhston, J.B. et J.N. Herron. 1979. A routine water monitoring test for mutagenic compounds, UIUC-WRC-79-0141, University of Illinois, Urbana, Il. 87 p.

Johnston, J.B. et M.K. Ferdeyen. 1981. Recovery of mutagens from water by the Parfait/distillation method, In "Chemistry in Water Reuse, Vol. 2", (W.J. Cooper, Ed.) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp 171-190.

Junk, G.A., J.J. Richard, M.D. Grieser, D. Witiak, J.L. Witiak, M.D. Arguello, R. Vick, H.J. Svec, J.S. Fritz et G.V. Calder. 1974. "Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants," J. Chromatogr, 99: 745-762.

Kavlock, R., N. Chernoff, B. Carver et F. Kopfler. 1979. "Teratology studies in mice exposed to municipal drinking water concentrates during organogenesis", Fd. Cosmet. Toxicol. 17: 343-347.

Kool, H.J. 1983. Organic mutagens and drinking water in the Netherland: A study on mutagenicity of organic constituents in drinking water in the Netherland. Thèse de doctorat, Rijks institut, Voor Drinkwater voorziening (the Hague).

Kopfler, F.C. 1982. Alternative strategies and methods for concentrating chemicals from water, Presented at the second symposium of Application of Short-Term Bioassays in Fractionation and Analysis of Complex Mixtures, In "Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II", EPA report PB 82-233263 in EPA 600/9-82-004.

Kopfler, F.C., E.W. Coleman, R.C. Melton, R.C. Tardiff, S.C. Tardiff, S.C. Lynch et J.K. Smith. 1977. "Extration and identification of organic micropollutants: Reverse osmosis method", Ann. N.Y. Acad. Sci., 298: 20-30.

Lang, D.R., H. Kurzepa, M.S. Cole et J.C. Loper. 1980. "Malignant transformation of BALB/3T3 cells by residue organic mixtures from drinking water", J. Environ. Pathol. Toxicol. 4: 41-54.

Le Bel, G.L., D.T. Williams, G. Griffith et F.M. Benoit. 1979. "Isolation and concentration of organophosphorus pesticides from drinking water at the ng/L level, using macroreticular resin", J. Assoc. off Anal. Chem. 62 (2): 241-249.

Leclair, J.M. et J.W. Willard. 1970. Guide for the preparation of submissions on food additives, Department of National Health and Welfare, Canada 31 p.

Levin, D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, E.A. Schwiers et B.N. Ames. 1982. "A new Salmonella tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxydative mutagens", Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 7445-7449.

Litchfield, J.T. et F.A. Wilcoxon. 1947. "A simplified method of evaluating dose-effect experiments", J. Pharm. exp. Ther., 95: 99-113.

Loper, J.C. 1980. "Mutagenic effects of organic compounds in drinking water", Mutation res. 76: 241-268.

Loper, J.C. et W. Tabor. 1982. Detection of organic mutagens in water residues, presented at the Second Symposium on Application of Short-Term Bioassays in Fractionation and Analysis of Complex Mixtures, In "Short-term Bioassays in The Analysis of Complex Environmental Mixtures" EPA report PB82-233271 in EPA 600/9-82-004.

Loper, J.C., D.R. Lang, R.S. Schoeny, B.B. Richmond, P.M. Gallaher, C.C. Smith. 1978. "Residue organic mixtures from drinking water show in vitro mutagenic and transforming activity", J. Toxicol. Environ. Health, 4: 919-938.

Mantel, N. et R. Bryan. 1961. "Safety tersting of carcinogenic agents", J. Nat. Cancer Institute, 27(2): 455-470.

Mantel, N., N.R. Bohidar, C.C. Brown, J.L. Ciminera et J.W. Tukey. 1975. "An improved Mantel-Bryan procedure for "safety" testing of carcinogens", Cancer. res., 35: 865-872.

Maron, D.M. et B.N. Ames. 1983. "Revised methods for Salmonella mutagenicity test", Mutation res. 113: 173-215.

McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori et B.N. Ames. 1975. "Detection of carcinogens and mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmid", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 979-983.

McCann, J., L. Horn et J. Kaldor. 1984. "An evaluation of Salmonella (Ames) test data in the published litterature: Application of statistical procedures and analysis of mutagenic potency", Mutation research", 134: 1-47.

Mc Carty, P.L., J. Kissel, T. Everhart, R.C. Cooper et C. Leong. 1980. Mutagenic activity and chemical characterization for the Pal Alto waste water reclamation and ground water injection facility. Tech. Rep. No 254, Dept. Civil Engineering, Standford University, Standford. California, 65 pp.

Meier, J.R. et J.R. Bull. 1984. Mutagenic properties of drinking water desinfectants and by products, EPA report PB84-246321 in EPA 600/D-84/224.

Meier, J.R., R.D. Lingg et R.J. Bull. 1983. "Formation of mutagens following chlorination of humic acid: A model for mutagen formation during drinking water treatment", Mutation research, 118: 25-41.

Ministère de l'Environnement du Québec. 1981. Hydrogéologie et contamination des eaux souterraines, la ville de Mercier, Hydrogeo Canada. 28 pp.

Mrozek, E. Jr., E.D. Seneca et L.L. Hobbs. 1982. "Polychlorinated biphenyl uptake and translocation by Spartina alterniflora Loisel", Water, Air and soil Pollution, 17: 3-15.

National Cancer Institute Comparative, Cité par Brusick, 1983.

National Research Council. 1982. Quality Criteria for Water Reuse, Panel on Quality Criteria for Water Reuse, National Academy Press. Washington D.C. 235 pp.

Neal, R.A. 1980. Known and project toxicology of chlorination by products, In "Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects, Vol. 3," (R.L. Jolley, W.A. Brungs et R.B. Cumming, Eds.) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp 1007-1017.

Nellor, M.H., R.B. Baird et W.E. Garrison. 1981. Health Effects of water reuse by bround water recharge, County Sanitation districts of Los Angeles County, Whittier, Calif., 31 p.

Nellor, M.H., R.B. Baird et J.R. Smyth. 1984a. Health effects study, County Sanitation Districts of Los Angeles County, Final Report, EPA report PB84-191568.

Nellor, M.H., R.B. Baird et J.R. Smyth. 1984b. Health effects study, Los Angeles county sanitation districts: Summary. EPA report PB84-191550.

Nestmann, E.R., G.L. LeBel, D.T. Williams et D.J. Kowbel. 1979. "Mutagenicity of organic extracts from Canadian drinking water in the Salmonella/mammalian-microsome assay", Environmental mutagenesis, 1: 337-345.

Nestmann, E.R., R. Otson, G.L. LeBel, D.T. Williams, E.G:H. Lee et D.C. Biggs. 1983. Correlation of water quality parameters with mutagenicity of drinking water extracts, In "Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects, vol. 4." (Jolley, R.L. et al., eds.) Ann Arbor science pu. CO. Ann Arbor, Michigan. pp. 1151-1164.

Organisation mondiale de la santé. 1959. Méthodes d'essai toxicologique des additifs alimentaires, Rapport technique no. 144.

Organisation mondiale de la santé. 1979. Critères d'hygiène de l'environnement 6: Principes et méthodes d'évaluation de la toxicité des produits chimiques. Partie 1, O.M.S. Genève 288 p.

Pienta, R.J., J.A. Poiley et W.B. Lebherz. 1977. "Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopressured primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens," Int. J. Cancer. 19: 642-655.

Pitt, W.W. et C.D. Acott. 1973. Measurement of molecular organic contaminants in polluted water; In "Ecology and Analysis of Trace Contaminants", Progress Report, June 1972 - January 1973, ORNL-NSF-EATC-1.

Poirier, L. et F.J. de Serres. 1979. "Initial National Cancer Institut studies on mutagenesis as a prescreen for chemical carcinogenesis: An appraisal", J. Natl. Cancer Inst. 62: 919-926.

Portman, R.S., K.M. Plowman et T.C. Campbell. 1970. "On mechanisms affecting species susceptibility to aflatoxin", Biochem. Biophys. Acta 208: 487-495.

Purchase, I.F.H.. 1982. ICPEMC (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens) Working paper 2/6. "An appraisal of predictive tests for carcinogenicity", Mutation res. 99: 53-71.

Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre et F.R. Westwood. 1978. "An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens", Br. J. Cancer. 37: 873-903.

Rall, D.P.. 1974. "Problems in low doses of carcinogens", J. Wash. Acad. Sci. 64 (2): 63-68.

Rall, D.P.. 1969. "Difficulties in extrapolating the results of toxicity studies in laboratory animals to man", Environ. res. 2(5-6): 360-367.

Rinkus, S.J., M.S. Legator. 1979. "Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their cororelation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system", Cancer res. 39-: 3289-3318.

Robinson, M., J.W. Glass, D. Cmehil, R.J. Bull et J. Orthoefor. 1982. The iniating and promoting activity of chemicals isolated from drinking waters in the Sencar mouse: A five city survey, Presented at the Second Symposium on Application of Short Term bioassays in the Fractionation and the Analysis of Complex Mixtures, In "Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures", EPA report PB 82-233297 in EPA - 600/9-82-004.

Rosenkranj, H.S. et L.A. Poirier. 1979. "Evaluation of the mutagenicity and DNA modifying activity of carcinogens and non-carcinogens in microbial systems", J. Natl. Cancer Inst. 62: 873-892.

Ross, W.D., W.S. Hillan, M.T. Wininger, J. Gridley, L.F. Lee. R.J. Hare et S.S. Sandhu. 1982. Aqueous effluent concentration for application to biotest systems. Presented at the Second Symposium on Application of Short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Mixtures, In "Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures" EPA report PB82-233305 in EPA 600/9-82-004.

Santé et Bien-être, Canada. 1973. The testing of chemicals for carcinogenicity, mutagenicity, teratogenicity.

Shapiro, J. 1961. "Freezing out, a safe technique for concentration of dilute solutions", Science, 133: 2063-2064.

Shelby, M.D. et I.F.H. Purchase.1982. Assay systems and criteria for their comparisons, In "Progress in Mutation Research. Vol. 1: Evaluation of Short-term tests for carcinogens: Report of the International Collaborative Program" (F.J. de Sèvres et J. Ashby. eds.) Elsevier/North Holland. Inc. New York. pp. 16-20.

Simmon, V.F.. 1979. "In vitro mutagenicity assays for chemical carcinogens and related compounds with Salmonells typhimurium", J. Natl. Inst. Cancer 62(4): 893-899.

Staples, R.E., W.C. Worthy et T.A. Marks. 1979. "Influence of drinking water - tap versus purified - on embryo and fetal development in mice", Teratology, 19: 237-243.

Styles, J.A.. 1977. "A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture", Br. J. Cancer. 36: 558-563.

Styles, J.A.. 1981. Activity of 42 coded compounds in the BHK-21 cell transformation test, In "Progress in Mutation Research, Vol 1: Evaluation of Short-term tests for carcinogens, Report of the International Collaborative Program," (F.J. de Serres et J. Ashby, eds.) Elsevier/North Holland, New York. pp. 639-646.

Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Mursushima, Y. Semo, M. Takeuchi et T. Kawachi. 1976. Overlaping of carcinogens and mutagens, In "Fundamentals in cancer prevention", (P.N. Magee et al. eds.) University of Tokyo Press. pp. 191-215.

Suovaniemi, O., P. Ekholm, K. Falck, E. Kaukanen, R. Kinnunen, P. Partanen, M. Sorsa et H. Vainio. 1984. An automated analysis system for Bacterial mutagenicity assays, International Laboratory, Octobre 1984.

Tabor, M.W. et J.C. Loper. 1985. "Analytical isolation, separation and identification of mutagens from non volatile organics of drinking water", Inter. J. Environ. Anal. Chem. 19: 281-318.

Tabor, M.W., J.C. Loper, K. Barone. 1980. Analatycal procedures from fractionating non volatile mutagenic components from drinking water concentrates, In "Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects, Vol. 3.." (R.L. Jolley et al. eds.) Ann Arbor science pu. Ann Arbor. Michigan. pp. 899-912.

Thompson, W.R.. 1947. "Use of moving averages and interpolation to estimate median effective dose, I. Fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods", Bact. Rev. 11: 115.

Thruman, E.M., B.L. Malcolm et G.R. Aiken. 1978. "Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrilyc resin", Anal. Chem. 50: 775-779.

U.S. Federal Register. 1984. Chemical carcinogens: Review of the science and its associated principles, may 1984, Office of Science and Technology Policy, U.S. Federal Register, 49:(100): 21594-21661.

Van Coillie, R.N. Bermingham et C. Blaise. 1984. Approche intégrée pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents, In "Comptes rendus de la conférence sur les tests biologiques et évaluation des risques", (R. Van Coillie, N. Bermingham et C. Blaise, éds.), Publié par le Laboratoire des Services de la protection de l'Environnement. Longueuil, Québec. pp. 189-255.

Vogel, E., W.G.H. Blijleven, P.M. Klapuijk et S.A. Zijlstra. 1980. Some current perspectives of the application of Drosophila in the evaluation of carcinogens, In "The predictive Value of Short-term Screening test in carcinogenicity Evaluation", (E.M. Williams et al. eds.), Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp. 125-147.

Waters, M.D., N.E. Garret, C.M. Covone-de-Serres, B.E. Howard et H.F. Stack. 1982. Genetic Toxicology on some known or suspected human carcinogens, In "Chemical Mugatens: Principles and Methods for their Detection, vol 8", F.J. de Serres et A. Hollaender, Eds.) Plenum press. Baltimore, Md.

Weber, J.B. 1972. Interaction of organic pesticides with particulate matter in aquatic and soil systems, In "Advances in Chemistry Series, Number 111, Fate of Organic Pesticides in the Aquatic Environment" American Chem. Soc. pp. 55-120.

Weber, J.B.. 1978. Fate of organics in sludges applied to land, In "The 5th National Conference on Acceptable Sludge Disposal Technics, Orlando, Florida". (Communication personnells).

Weil, C.S. 1952. "Relationship between short and long-term feeding studies in designing an effective toxicity test", Agric. Food Chem. 11: 486-491.

William, D.T., E.R. Nestmann, G.L. LeBel, F.M. Benoit et R. Otson. 1982. "Determination of mutagenic potentiel and organic contaminants of Great Lake drinking water", Chemosphere, 11(3): 263-276.

Wyrobek, A.J. et W.R. Bruce. 1975. "Chemical induction of sperm abnormalities in mice", Proc. Natl. Acad. Sci. 72:4425-4429.

Yearly, R.A. et R.A. Benish. 1965. "A comparison of the acute toxicities of drugs in new-born and adult rats", Toxicol. Appl. Pharmacol., 7:504.

Zeiger, E. 1983. "An overview of genetic toxicity testing in the National Toxicology Program", Ann. N.Y. Acad. Sci. 407:387-394.

ANNEXE 1

EXPRESSION MATHÉMATIQUE DES COURBES DOSE-RÉPONSE

Tirée de OMS, 1979

Critères d'hygiène de l'environnement 5

Principes et méthodes d'évaluation de la toxicité des produits chimiques. Partie I

Publié sour la double égide du Programme des Nations Unies pour l'Environnement et de l'Organisation mondiale de la Santé

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ GENÈVE 1979

Annexe

EXPRESSION MATHÉMATIQUE DES RELATIONS DOSE-EFFET ET DOSE-RÉPONSE

On peut construire graphiquement les relations dose-effet et dose-réponse. L'examen des courbes obtenues suggère la forme: linéaire, fonction puissance ou exponentielle, des équations les plus aptes à décrire les phénomènes, après quoi on peut calculer les coefficients permettant d'ajuster au plus près les courbes théoriques et les courbes réelles. Un seul jeu de données peut très bien cadrer avec plusieurs équations mathématiques lorsqu'on n'utilise qu'une portion restreinte de la courbe. Il faut donc prendre bien soin de ne pas admettre que des événements biologiques se déroulent selon un modèle mathématique déterminé à moins que les données servant à la construction des points n'aient été collectées sur une large gamme de valeurs.

Toutes les fois que c'est possible, on a intérêt à élaborer une hypothèse quant au mécanisme de l'action toxique sur le terrain biologique, à en déduire l'expression mathématique de ce mécanisme et puis à introduire les données dans l'équation pour calculer les valeurs des constantes de cette équation; elles seront spécifiques, évidemment, des conditions de l'expérience. Un mécanisme peut, par exemple, indiquer que la loi d'action de masse (équilibre chimique) s'applique à la relation dose-effet. Si on admet alors 1) qu'une molécule du produit chimique étudié s'unit réversiblement à un site récepteur; 2) que l'effet (E) est directement proportionnel à la fraction de l'ensemble des récepteurs qui est liée à la substance; et 3) que la partie de la substance unie à des récepteurs est très petite par rapport à la quantité totale ou dose (D), la loi d'action de masse conduit à une relation de la forme: $E = K_1 D/(K_2 + K_1 D)$ où K_1 et K_2 sont des constantes spécifiques des conditions d'expérience. Clark (1933) relève que cette équation, qui se traduit par une courbe d'équilibre tendant asymptotiquement vers l'effet maximal, présente une forme très analogue, du moins dans une certaine plage de doses, à la courbe logarithmique de la forme $E = K_1 \log (K_2 D + 1)$, ou encore à une fonction puissance comme $E = K_1 D^{K_2}$.

La sigmoïde, ou courbe en S, est une expression graphique couramment observée de certaines relations dose-effet et de la plupart des relations dose-réponse. On peut partiellement expliquer la base biologique de cette relation en examinant la distribution des fréquences des sensibilités (ou résistances) individuelles au sein d'une population. La plupart des individus vont réagir à un niveau voisin de la valeur médiane, et quelques-uns ne répondront qu'à des niveaux très faibles ou très élevés. Cela entraîne une distribution des

fréquences individuelles fonction de la dose. Mais une distribution de fréquences ne décrit pas le mécanisme biologique qui conditionne la sensibilité, ou la résistance, mais seulement l'existence aléatoire d'individus de sensibilité différente.

La fig. 1.1 montre une distribution normale des fréquences: la courbe est symétrique par rapport à un point. Le graphe de la distribution des fréquences cumulées se traduit par la sigmoïde souvent observée. La relation dose-réponse s'examine en utilisant les fréquences cumulées parce que, bien

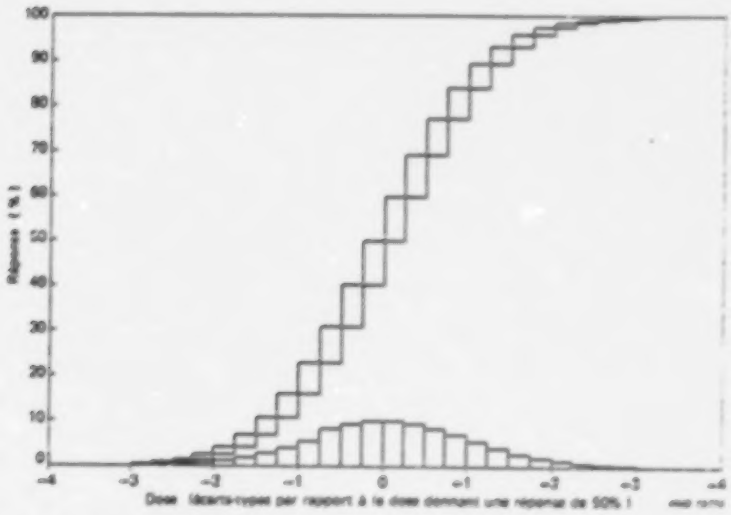


Fig. 1.1 Histogramme hypothétique dose-réponse: distribution en fonction des fréquences et en fonction des fréquences cumulées.

entendu, l'individu qui réagit à une faible dose réagit aussi aux doses plus fortes. Ainsi la fréquence des individus répondant à une dose élevée donnée comporte-t-elle tous ceux qui répondent à la dose en question et à toutes les doses inférieures.

La fig. 1.2 présente un déformation dans laquelle le maximum est déplacé vers l'axe des ordonnées, c'est-à-dire vers les faibles doses: cette distribution est souvent qualifiée de "log-normale", parce qu'une transformation logarithmique des abscisses tend à rendre à la courbe un aspect symétrique (fig. 1.3): en effet, utiliser une échelle logarithmique revient à tracer un réseau d'ordonnées non plus équidistantes, mais beaucoup plus écartées pour les faibles abscisses que pour les grandes, donc à obtenir une courbe

dont le maximum s'est apparemment éloigné de l'axe des ordonnées. La nature offre très souvent des distributions de fréquences d'allure log-normale. On retrouve également cette forme lorsque le point central de la distribution des fréquences observées est très près du zéro: comme la dose ne peut pas être inférieure à zéro, il n'y a que peu de place sur l'axe des abscisses pour y entasser l'ensemble des individus très sensibles. Outre les

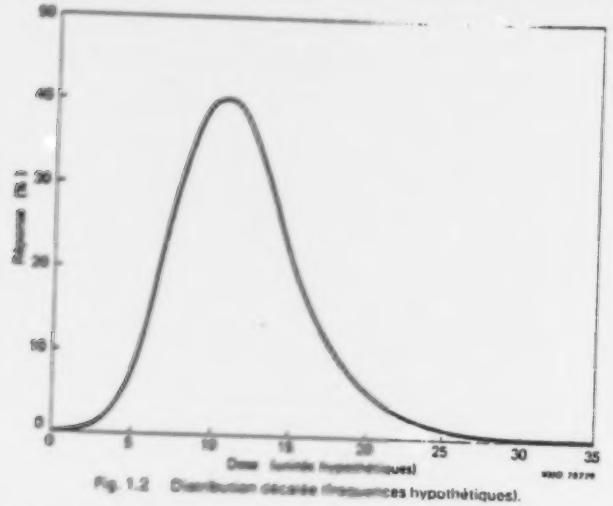


Fig. 1.2 Distribution décalée (fréquences hypothétiques).

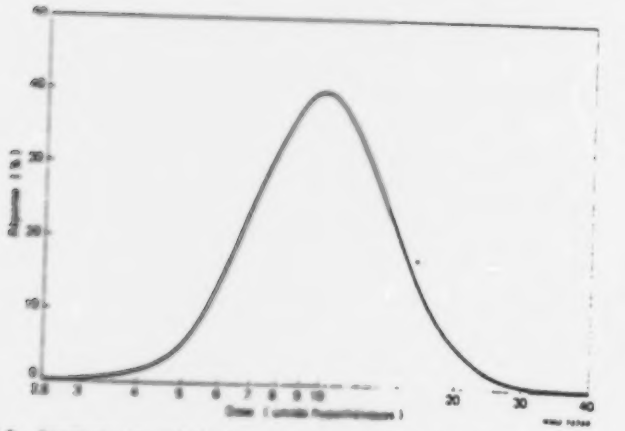


Fig. 1.3 Distribution ramenée à la forme normale par l'emploi d'abscisses logarithmiques

distributions log-normales, il y a de nombreux autres types de distributions dissymétriques.

L'équation de la courbe en S est difficile à manier et, souvent, on la transforme en droite pour la présentation et de l'évaluation des données. C'est une des caractéristiques de la distribution normale que les points d'inflexion de la courbe, situés de part et d'autre du maximum (correspondant à la valeur moyenne) aient des abscisses égales à la valeur moyenne m augmentée et diminuée d'un écart type (σ). L'intégration de la fonction normale montre que la surface située sous la courbe entre les ordonnées

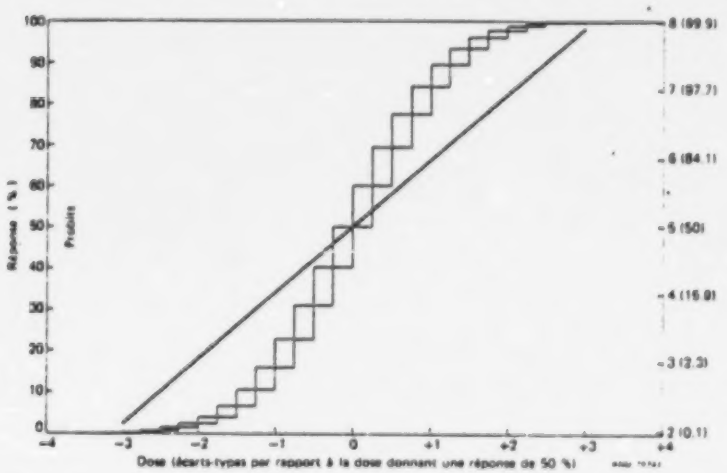


Fig. 1.4 Transformation en droite de la sigmoïde des pourcentages par l'utilisation de probits pour les ordonnées.

d'abscisses $m - 1\ \sigma$ et $m + 1\ \sigma$ représente 68,3% de la population totale, ce qui veut dire que 15,9% de la population se compose d'individus sensibles à des doses correspondant à des valeurs inférieures ou égales à $m - 1\ \sigma$, et 84,1% à des valeurs inférieures ou égales à $m + 1\ \sigma$. On trouverait de même que environ 95,4% de la population répondrait à des doses correspondant à $m \pm 2\ \sigma$, et environ 99,8% à des doses correspondant à $m \pm 3\ \sigma$.

Puisque $m - 3\ \sigma$, $m - 2\ \sigma$, $m - 1\ \sigma$, m, $m + 1\ \sigma$, $m + 2\ \sigma$ et $m + 3\ \sigma$ représentent des intervalles égaux, la construction graphique des pourcentages d'individus sensibles en fonction des ces abscisses, savoir 0,1, 2,3, 15,9, 50, 84,1, 97,7 et 99,9 donnera une droite. La fig. 1.4 illustre cette transformation: on y a donné, d'une part, la courbe en S (sigmoïde) correspondant à des ordonnées exprimées en pourcentage et, d'autre part, la

droite résultant de l'utilisation, maintenant courante, d'ordonnées exprimées en "probits"*. Finney (1971) a présenté l'historique de la mise au point de la transformation par probits et de son utilité. De nombreux toxicologues utilisent du papier gausso-logarithmique pour construire les fonctions linéaires exprimant la relation dose réponse lorsque la distribution est log-normale.

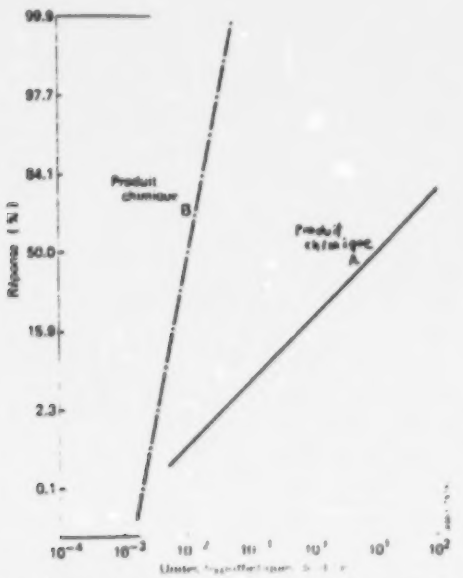


Fig. 1.5 Courbes dose-réponse pour deux produits chimiques différents.

La fig. 1.5 illustre deux courbes dose réponse tracées sur du papier gausso-logarithmique. La valeur de la DE_{50} (dose efficace 50%) pour le produit chimique A est de 10 unités de dose, alors que pour la substance B, elle n'est que de 0,01 unité de dose. On trouve souvent dans la littérature les données de DE_{50} présentées comme une valeur unique de dose, sans indications des limites de confiance ni de la pente de la courbe dose-réponse. Il est clair, d'après la fig. 1.5, que pour les produits A et B dont les DE_{50} sont dans l'ordre de 1 à 1000, les systèmes d'épreuve donnent des réponses tout à fait différentes.

On peut considérer comme un exemple de la nécessité de tenir compte de

* "Probit" est l'abréviation utilisée pour "unité de probabilité". C'est la variable réduite majorée de cinq pour éviter les nombres négatifs.

la pente des courbes l'habitude qu'ont certains toxicologues d'étudier les effets des doses répétitives à des valeurs égales à 1/10 de la DE_{50}. Pour la substance A, on constaterait déjà un effet sur 16% de la population (DE_{16}) dès la première administration de la dose répétitive, alors que, pour la substance B, il est tout à fait probable qu'on ne constatera jamais d'effet, même après des administrations répétées (fig. 1.5). Ce phénomène peut être prévu si on connaît la pente des courbes.

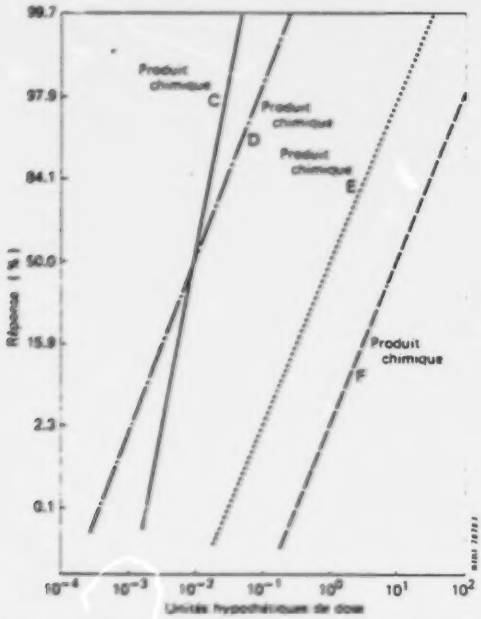


Fig. 1.6 Courbes dose-réponse pour quatre produits chimiques différents.

Les faibles pentes, comme celle de A, sont souvent le signe de phénomènes comme une faible absorption, une excrétion ou une détoxication rapides ou des effets toxiques se manifestant quelque temps après l'administration. Les fortes pentes, comme celle de B, indiquent le plus souvent une absorption rapide et une prompte manifestation des effets toxiques; il en va ainsi par exemple avec le cyanure d'hydrogène ou les gaz irritants. Si la pente n'est pas un indicateur absolument sûr en matière de mécanismes physiologiques ou toxicologiques, elle représente néanmoins un élément utile au toxicologue expérimenté et devrait toujours être notée en même temps que les limites de confiance.

La fig. 1.6 illustre l'importance du parallélisme des courbes dose-réponse dès qu'on veut énoncer des constatations générales en matière d'effets relatifs. Les produits chimiques C et D ont certes des DE_{50} identiques, mais l'égalité relative de leurs effets n'est vraie que pour cette dose particulière. En fait, à des doses supérieures, la substance C serait plus efficace que D, et ce serait l'inverse à des doses inférieures. En revanche, les produits E et F donnent des résultats sensiblement équivalents pour des doses dans le rapport de 1 à 10 et cela dans tout le domaine des doses utilisées. On doit cependant spécialement noter que les courbes des substances E et F ne s'appliquent qu'à un effet spécifique et à un ensemble de conditions expérimentales. L'observation des réponses correspondant à un autre effet toxique, ou l'administration de la substance par une voie différente, ou encore l'emploi d'une autre espèce animale, pourraient très bien produire des courbes dose-réponse pour ces mêmes produits qui ne soient pas parallèles.

ANNEXE 2

DESCRIPTION DES TESTS RAPIDES DE GÉNOTOXICITÉ ET CANCÉROGÉNICITÉ DISPONIBLES À CE JOUR

1. Évaluation directe des dommages subis par l'ADN

Les tests suivants visent à évaluer les dommages subis par l'ADN suite à l'exposition des cellules à un agent mutagène. Cette évaluation peut être réalisée soit en déterminant directement les dommages physiques subis par l'ADN ou en estimant l'activité des systèmes de réparation de l'ADN. Le mécanisme de réparation par excision est l'activité au cours de laquelle les bases endommagées sont reconnues, excisées et remplacées par des bases nouvelles. C'est le premier processus qui entre en jeu lorsque l'ADN subit des dommages.

Dans la présentation de ces techniques, nous ne discuterons ni de leur coût ni de leur charge de travail car toutes ces méthodes requièrent une bonne expertise en biologie moléculaire et un appareillage élaboré. De plus, à ce jour, ces méthodes ont été utilisées par un nombre limité de laboratoires et aucune corrélation n'a encore été établie entre la cancérogénicité d'un produit et sa capacité à provoquer des lésions de l'ADN évaluées par les techniques directes.

1.1 Évaluation des dommages physiques

a) En gradient du sucrose alcalin

On évalue le nombre de brisures dans le brin d'ADN à partir du poids moléculaire moyen de l'ADN. Celui-ci sera d'autant moins élevé que les brisures sont nombreuses. Le nombre de brisures est évalué à partir du rapport entre le poids moléculaire moyen d'une molécule d'ADN non exposé et le poids moléculaire moyen d'une molécule ADN exposée au produit testé.

Les cellules sont marquées à la thymidine radioactive, puis exposées à l'agent. Elles sont par la suite lysées et déposées sur un gradient de sucrose alcalin calibré. Après centrifugation on évalue à l'aide d'un compteur à scintillations la quantidé d'ADN contenu dans chaque fraction.

souches: au choix

fibroblastes humains

cellules L de souris.

référence: Cleaver J.E., 1977. Methods for studying excision repair of DNA damaged by physical and chemical mutagenes. In Handbook of mutagenicity test procedures p19-48. Kilbey B.J., M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, editeurs Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.

référence originale: Lett S.T., I Caldwell, C.S. Dean et P. Alexander 1967. Rejoining of X-ray induced breaks in the DNA of leukaemia cells, Nature, 214 790-792.

1.1 b) Par la vitesse de séparation des brins d'ADN

La dénaturation de l'ADN est le phénomène par lequel les deux brins (chaine monocaténaire) constituants le molécule d'ADN se séparent l'une de l'autre. En milieu alcalin la dénaturation de l'ADN procède à partir de chaque interruption simple de la chaine. Après un temps donné le nombre de fragments d'ADN monocaténaire sera d'autant plus important que le nombre de "bris dans la chaine" est élevé au départ. La proportion d'ADN monocaténaire est alors un indice des dommages subis par l'ADN.

Des cellules marquées par un isotope radioactif sont exposées à un agent, l'ADN en extrait, puis plongées dans une solution alcaline. Après un temps déterminé on met fin à la dénaturation, la proportion d'ADN

monocaténaire est déterminée par des méthodes connues telles la susceptibilité à la nucléase S1 ou la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. (hydroxyapatite chromatography).

référence originale: Rudberg. B., 1975. The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. Radiation res 61, 279-287.

1.1 c) Par élution alcaline (alkaline élution)

Cette méthode repose sur le même principe de base que la précédente. Les cellules marquées et traitées sont lysées sur un filtre et soumises au flux constant d'une solution alcaline. Les brins monocaténaires ont un poids moléculaire plus faible et traverserait plus rapidement le filtre. La vitesse d'écoulement peut être comparée à celle d'un témoin interne.

souches: au choix

référence originale: Fornace A.J., Jr et K.W. Kohn, 1976, DNA protein cross-linking by ultra-violet radiation in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 435, 95-103

1.2 Détection de l'incorporation de bases nouvelles

Les méthodes suivantes ont pour but d'évaluer la quantité de bases incorporées pendant la réparation de l'ADN. Elles doivent permettre de distinguer entre les mécanismes de réparation et les mécanismes de réplication de l'ADN au cours de la phase de croissance normale de la cellule.

1.2 a) Synthèse d'ADN déphasée (unscheduled D.N.A. synthesis)

On mesure, par autoradiographie, l'incorporation de (^{3}H) thymidine dans l'ADN de cellules en culture. L'ADN qui a subit une réplication normale pendant la phase de croissance peut se distinguer de l'ADN qui a subit une réparation par l'intensité de la radioactivité.

Des cellules sont exposées à l'agent. On ajoute au milieu la thymidine marquée. La réparation peut se prolonger au delà de 24 heures. Après la période de marquage les cultures sont fixées et développées. Parfois la réplication normale de l'ADN est inhibée en ajoutant un agent inhibiteur approprié.

souches: culture de cellules humaines ou de rongeurs in vivo (tissus germinaux ou somatique).

référence originales: Rasmussen R.E., R.B. Painter, 1966 Radiation stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells, J. cell. Biol. 29, 11-19.

avec cellules Hela: Martin, C.N., A.C. McDermid, R.C. Garner, 1978 Testing of known carcinogens and non carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in Hela Cells. Cancer. res. 38, 2621-2627.

1.2 b) Incorporation stimulée de (^{3}H) thymidine (Stimulated (^{3}H) thymidine incorporation)

En absence de la réplication normale le taux d'incorporation de bases dans l'ADN de cellules préalablement exposées à un agent mutagène, est fonction de l'intensité des mécanismes de réparation.

Les cellules au repos sont marquées à la (^{3}H) thymidine après avoir été exposées au produit testé. On mesure ensuite la radioactivité de l'ADN.

souches: lymphocytes périphériques

remarques: les résultats obtenus à partir de ces types de cellules ne s'étendent pas nécessairement à d'autres types de cellules.

référence: Lieberman, M.W., M.C. Poirier, 1973. Deoxyribonucleoside incorporation during DNA repair of DNA damage in human diploide fibroblasts. Cancer res. 33, 2097-2103.

1.2 c) Évaluation de la réplication de réparation à partir d'un gradient isopycnique

Il est possible de séparer l'ADN qui subit une réplication de réparation de celui qui subit une réplication semi-conservative (normale) en ajoutant au milieu, après exposition au produit, du bromodeoxyuridine. Lorsque celui-ci est incorporé en petite quantité (réparation) il ne modifie pas la densité de l'ADN, lorsqu'il est incorporé en quantité plus importante (réplication semi conservative) il augmente la densité de l'ADN de manière significative. La séparation se fait en gradient isopycnique. L'incorporation de bases est mesurée à l'aide d'un marqueur radioactif.

souches: cellules de lignées cellulaires ou prélevées

référence: Lohman, P.H.M., M.L. Sluyter et I.A.A. Mathijs, 1973.

Repair replication in human cells studied by sodium iodide isopycnic centrifugation of DNA in a fixed-angle rotor, Anal. Biochem., 54, 178-187.

1.2 d) Réplication de réparation mesurée par la photolyse du bromouracil

L'exposition de l'ADN à une lumière de longueur d'ondes de 313 nM provoque une coupure dans le brin à la hauteur du bromouracil. A cette longueur d'ondes l'ADN normal n'est pas affecté. Si le bromouracil est présent dans le milieu pendant la réparation le nombre de coupures provoquées par l'exposition à la lumière est alors fonction de l'intensité des dommages causés par un produit.

Des cellules marquées à la radioactivité sont exposées au produit. On ajoute au milieu du bromouracil et un inhibiteur de la réplication semi conservatrice. Les cellules sont exposées à la lumière (L=313 nm) puis lysées et déposées à la surface d'un gradient de sucrose alcalin ce qui permet de séparer les fractions selon leur poids moléculaire.

souches: non spécifiées

référence originale: Regan, J.D., R.B. Setlow et R.D. Ley, 1971, Normal and defective repair of damaged DNA in human cells: a sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 68, 708-712.

2. Tests de mutagénicité

A l'aide d'un milieu de culture sélectif pour un type de mutant spécifique, il est possible de détecter les agents qui induisent des mutations

de l'ADN qui se traduisent par une modification d'un phénotype particulier de la cellule.

2.1 Tests de mutagenicité utilisant des micro-organismes

2.1 a) Test de Ames (mutation Réverse)

Certaines mutations engendrent chez les individus d'une souche de Salmonella typhimurium auxotrophe pour l'histidine, une réversion vers la prototrophie. Ces mutants peuvent être sélectionnés sur un milieu minimal dépourvu d'histidine.

Les souches de S. typhimurium développées par Bruce Ames et ses collaborateurs présentent certaines caractéristiques qui les rendent particulièrement sensibles aux agents mutagènes. Ce sont un système déficient de réparation par excision, la perte de la barrière de lypopolysaccharides qui enrobe la surface de la cellule et chez les souches TA102 et TA98 l'addition d'un plasmide porteur d'un gène qui rend la cellule plus susceptible aux agents mutagènes.

De plus l'ajout au milieu de culture d'homogénat de foie préalablement induit (mélange S-9) permet de bénificier d'un système d'activation métabolique de mammifères et d'étendre les possibilités de détection aux classes de procarcinogènes.

La culture cellulaire, le mélange S-9, le produit testé et de l'agar sont incorporés ensembles et versés sur un milieu solide sélectif. Après la période d'incubation requise, on dénombre les colonies révertantes. De ce nombre on soustrait le nombre de réversions spontannées qui ont lieu en absence du produit testé.

souches: Les auteurs recommandent un minimum de quatre souches en

raison de leur spécificité propre

- TA97, TA98, TA100, TA102

La raison est que chaque souche porte une mutation spécifique qui peut être renversée par un groupe spécifique d'agents mutagènes.

charge de travail: 1 personne à temps plein par produit analysé.

coûts: en moyenne 2 600 $ par produit testé

temps: 2 à 3 semaines.

---

référence originale: Ames B.N., 1971, The detection of chemical mutagens with enteric bacteria In A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens: Principle and Methods for their Detection Vol 1, Plenum Press New York p. 267-282.

références (plus récente): Ames N.B., J. McCann et E. Yamasaki 1977. Methods for detecting carcinogens and mutagens (with Salmonella) mammalian-microsome mutagenicity test In Kilbey B.S. M. Legator, W. Nichols, C. Ramel. (eds.) Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Sc. Pa. Co. New York p. 1518.

référence (coûts): Brusick D. et A. Auletta 1984, Developmental status of bioassays in genetic toxicology. Mutation res 153 (1-10).

2.1 b) Test avec E-coli B/r WP-2

Le principe et la méthodologie sont les mêmes que pour le test de Ames. Les souches B/r WP-2 de E. coli sont auxotrophes pour le tryptophane. Les souches B/rWP-2 sont aussi dotées d'un système de réparation de l'ADN déficient. Mais à la différence de S typhimurium, le type de défectuosité varie d'une souche à l'autre.

Ce test détecte sensiblement les mêmes produits mutagènes que le test de Ames mais a le désavantage d'avoir été utilisé beaucoup moins souvent.

souches: les auteurs recommandent quatre souches en raison de leurs caractéristiques propres: WP2, WP2 UVRA, WP67, CM611.

charge de travail: 1 personne à temps plein

coûts: en moyenne 1000 $ par produit

temps: 3 à 4 semaines

référence originale: Bridges B.A., 1972. Simple bacterial Systems for detecting mutagenic agents, laboratory practice, 22, 413-419.

référence: Gleen M.H.C., et W.J. Maniel 1977 Mutagen testing using TRP+ reversion in Escherichia coli. In Kilbey B.J. M. Legator, W. Nichols, C. Ramel (Eds.) Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Sc. Co., Amsterdam, p. 65-94

2.1 c) Test de mutagénicité avec Saccharomyces cerevisiae (directe)

i. Une souche mutante de la levure Saccharomyces cerevisiae est utilisée pour ce test. Les mutants au locus ade 2 accumulent un pigment rouge. La synthèse de ce pigment peut être bloquée par de nouvelles mutations au niveau des différents gènes impliqués dans les étapes antérieures de la synthèse des purines. Lorsque ces mutations se produisent les colonies inoculées sur un milieu pauvre en adenine prennent une coloration rose ou blanche.

Les cellules sont exposées au produit et inoculées sur un milieu pauvre en adénine. Après une période d'incubation de quelques jours on dénombre le nombre de colonies total et de colonies mutantes.

souches:	Saccharomyces cerevisiae forme haploide ade 2
charge de travail:	1 personne à temps plein + 1 aide occasionnelle
coûts:	aucune donnée
temps:	minimum 10 jours pour les manipulations

référence originale: Reman H., 1956. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast, Compt. Rend., trev. lab Carlsbert. 26, 299-314.

ii) Test de mutagénicité avec S. cerevisiae (mutation réverse)

On utilise pour ce test une souche connues de S. cerevisiae auxotrophe pour l'adénine ou le tryptophane, la réversion vers la prototrophie, suite à l'exposition de la levure à un agent, est un indice que cet agent est mutagène. (En autant que le taux de réversion induite soit supérieur au taux spontané).

Les cellules sont exposées à l'agent puis inoculées sur un milieu complet et un milieu sélectif. La fréquence est obtenue en divisant le nombre de revertants sur milieu sélectif par le nombre de survivants sur le milieu complet.

souches: Saccharomyces cerevisiae D4, ade 2, trp5

coûts: -

temps 12 jours minimum

possibilité d'utiliser d'autres souches: XV185-14C, 5221, 5138, etc...

référence: Zimmerman F.K., 1977 Procédures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast Saccharomices cerevisiae In Kilbey B.J., M. Legator, W. Nichols, C. Ramel (Eds.) Handbook of mutagenicity test procedures, Elsevier Sci. Pa. Co. Amsterdam p. 119-134.

Hollstein M., J. McCann, F.A. Angelosanto et W.W. Nichols, 1979. Short Term tests for carcinogens and mutagens. Mutation res 65, 133-226.

2.1 d) Test de mutagénicité avec Saccharomyces cerevisiae administré à un animal hôte

Des cellules de la levure Saccharomyces cerevisiae sont injectées dans les organes (foie, poumons, testicules, cavité peritonéale) d'animaux hôtes (souris ou rats). On administre à ces animaux, une certaine dose du produit testé. Après un temps variable les animaux sont sacrifiés et les levures sont récupérées au niveau des organes cibles.

Par la suite les levures sont inoculées sur milieu complet et sur milieu sélectif pour déterminer respectivement le nombre de survivants et le nombre de mutants. Des tests sont menés paralellement in vitro en absence de système d'activation. Ce système permet d'évaluer l'effet du système d'activation propre à chaque organe sur le potentiel mutagène d'un agent.

animaux:	souris ou rats minimum de 5 par concentration
souches:	Saccharomyces cerevisiae D-3, D-4, D-5, D-6, D-7, MP-1
coûts:	-
charge de travail:	1 personne, plus aide occasionnelle
temps:	minimum 16 jours.

référence originale:	Fahrig, R., 1973. Metabolic activation of mutagens in mammals, Host mediated assay utilizing the induction of mitotic gene conversion in Saccharomyces cerevisiae, Agents and actions, 3, 99-110.
Référence:	Fahrig, R., 1977, Host mediated mutagenicity tests - yeast systems. Recovery of yeast cells out of tests, liver, lung and peritoneum of rats dans Kilbey B.J. M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, (Eds.) Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier Sci. Pu. Co. Amsterdam p. 135-147

2.1 e) Test d'induction

Chez les souches lysogènes de bactéries, les phages dormants peuvent être induits suite à des lésions chromosomiques subies par la bactérie. Chez E. coli l'induction du phage lambda est causée soit par des altérations au niveau du gène cI qui code pour le répresseur du phage soit par le clivage protéolytique du répresseur. Ce clivage serait induit par l'enzyme Rec A impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

L'induction du phage, lorsque la bactérie est exposée à un agent est donc un indice que cet agent provoque des altérations au niveau de l'ADN.

référence: Devoret, R., 1979. Bacterial tests for potential carcinogens. Sci. Am. 241,(2),40-49

Test d'induction du phage lambda

Les cellules d'une souche de E. coli lysogène pour le phage lambda sont exposées au produit, puis incubées pour un courte période. La suspension bactérienne est diluée puis ensemencée sur un milieu de culture déjà recouvert d'une souche de E. coli sensible au phage. Après incubation on dénombre le nombre de plages de lyse.

souches lysogène: E. coli 58-161 env A

souche sensible au phage: E. coli C 600

temps: 14 jours

charge de travail: 1 personne

coûts: 2 000 $

Référence: Thompson, J.A. 1981. Mutagenic Activity of 42 coded compounds in the lambda Induction Assay In.

de Serres J., et J. Ashby (Eds) "Evaluation of Short Term Tests for Carcinogens". Elsevier Amsterdam, p. 224-235.

Référence originale: Price K.E., R.E. Buck, L. Lein 1964. System for detecting inducers of lysogenic Escherichia coli W1709 (λ) and its applicability as a screen for antineoplascic antibiotic. Appl. Microbiol. 12 428-435.

Zorotest

Pour ce test les auteurs utilisent une souche de E. coli dont les gènes codant pour l'utilisation et le métabolisme du galactose sont sous le contrôle du même répresseur que le prophage lambda. Sur un milieu de culture contenant un indicateur pour le galactose, les colonies de bactéries lysogènes sont blanches alors que les colonies dont le phage est induit prennent une coloration rouge.

souche: E. coli, EMT-1, EMT-2, EMT-3, EMT-4

temps 14 jours

coûts: 1 000 $

charge de travail: 1 personne

référence: Damby, C., Z. Toman et M. Radman, 1981, Zorotest, In De Serres J. et J. Ashby (Eds). Evaluation of Short Term Tests for Carcinogens Elsevier. North-Holland p. 219-223

référence originale: Moreau, P., A. Bailone et R. Devoret. 1976 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 73, 3700-3704.

2.1 f) Test de fluctuation des bactéries

Pour ce test on peut utiliser n'importe quelle souche de microorganismes auxotrophes normalement utilisée dans un test de mutation réverse. Les cellules sont exposées à un agent puis diluées et ensemencées dans un milieu sélectif liquide réparti dans 50 ou 100 tubes . Après le temps d'incubation requis on dénombre les tubes où on enregistre une croissance bactérienne significative révélant la présence de mutant. Ce test s'adapte très bien à des échantillons aqueux (Forster et Wilson 1981). Se basant sur le test de fluctuation, la Compagnie Labsystem Oy (Helsinsik, Finland) a commercialisé un appareil pour effectuer un test de mutagénicité en utilisant les souches de Ames. L'appareil à l'avantage de donner des résultats plus rapidement que le test de Ames en milieu solide. Toutefois, nous ne recommandons pas ce système car il n'a pas encore été éprouvé dans un assez grand nombre de laboratoires et les tests de fluctuations, il est reconnu, présentent souvent des artefacts lorsqu'ils sont effectués sur un mélange de produits.

souches: Salmonella typhimurium, E. coli WP-2.

coût: 1 000 $ - 1 500 $

temps: 9 jours

charge de travail: 1 personne à temps plein, 1 produit par 9 jours

référence: Hollstein M, J. McCann, F.A. Sheptosanto et W.W. Nichols, 1979. Short Term test for carcinogens and mutagens. Mutation res. 65, 133-226.

Glenn M.H.L. et W.S. Muriel. 1977. (déjà cité).

Forster R. et Wilson J. 1981. The application of mutagenicity testing to drinking water. J. Inst. Water Eng. Sci. 35, 259-274.

Référence originale: Ryan F.J. 1955. Spontaneous mutations in non dividing bacteria, Genetics 40 726-738.
Mutascreen:Annexe 3

2.2 Tests de mutagénicité avec cellules de mammifères

2.2 a) Mutation au locus TK avec cellules de lymphome (L5178Y) de souris

Le 5-bromodéoxyuridine est un substrat alternatif pour la thymidine kinase (tk) qui phosphoryle la thymidine en thymidilate. Lorsque le 5-bromodeoxyuridine est phosphorylé il devient léthal suite à son incorporation dans l'ADN. Une mutation au locus tk en rendant l'enzyme tk inactive permet aux cellules mutantes de survivre dans un milieu contenant du 5-bromodéoxyuridine.

Les cellules en suspension sont exposées à l'agent puis remises en culture le temps nécessaire pour que les mutations s'expriment dans le phénotype. Par la suite les cellules sont ensemencées sur un milieu sélectif contenant le 5-bromodéoxyuridine et incubées. Les taux de mutation et de survie sont évalués en relation avec ceux des cultures non exposées.

souches:	cellules de lymphome L 5178Y de souris TK +/-
temps:	4 à 7 semaines
coûts:	13 500 $ par produit
charge de travail:	1 personne

remarque: La conservation des lignées cellulaires lymphomatiques peut présenter un problème.

référence: Clive, D. et Spector J.A.F.S. 1977. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultures L 5178Y mouse lymphoma cells In Kilbey B.S., M. Legator, W. Nichols, C. Ramel (Eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedure. Elsevier, Amsterdam p. 161-179.

référence originale: Clive D., W.G. Flamm, M.R. Machesko et N.S. Berbeim. 1972. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. Mutation res. 16 77-87.

2.2 b) Mutation au locus HGPRT des cellules V79 de Hamster chinois

Suite à l'exposition à un agent les cellules mutantes au locus HGPRT peuvent être identifiées par leur résistances à la 8-azaguanine et à la 6-thioguanine. On peut ajouter à ce système la résistance à la ouabadine due à une mutation au locus Na^+/K^+ ATPase.

souches: cellules V79I ou V79II de hamster chinois

charge de travail: -

coûts: en moyenne 7 000 $ par produit

temps: 5 à 10 semaines

références: Arlett. C.F. 1977. Mutagenicity teting with V79 chinese hamster cells. In Hilbey B.J., M. Legator,

W. Nichols, C. Ramel (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedure", Elsevier, Amsterdam. p. 175-192

Hollstein M. et J. McCann, F.S. Angelosanto et W.W. Nichols. 1979. Short term test for carcinogens and mutagens. Mutation res. 65. 133-226.

Référence originale: Arlett C.F. 1972. Mutation testing with cultured mammalian cells. Lab. Practice 21. 420-423.

2.2 c) Mutation au locus HGPRT avec fibroblastes humains

Ce test repose sur le même principe de base que le précédent les gènes impliquées dans la synthèse de l'enzyme HGPRT sont situés sur le chromosome X, une mutation sur 1 seul chromosome suffit à modifier le phénotype des cellules.

Les cellules ne proviennent pas de lignée de cellules connues, mais sont prélevées par biopsie ou obtenues par l'intermédiaire des hôpitaux.

charge de travail: 2 personnes temps plein

coût: 10 000$

temps: minimum 6 semaines

références:

Jacobs L. et R. Demars 1977. Chemical mutagenesis with diploid human fibroblasts In Hilbey B.J., M. Legator, W. Nichols, C. Ramel (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedure.

Elsevier, Amsterdam p. 193-220

De Mars R, 1973. Mutations studies with human fibroblasts, Environm. Health Perspectives, Experimental Issue 6. 127-136.

Hollstein M. et J. McCann, F.S. Angelosanto et W. Nichols, 1979. Shorterm test for carcinogens and mutagens.Mutation res. 65. 133-226.

2.3 Test basés sur la déficience de réparation de l'ADN.

2.3 a)Escherichia coli pol A

Ce test permet de détecter les agents qui induisent des dommages chromosomiques sans toutefois préciser la nature de ces dommages. Il est basé sur le fait que les souches de bactéries dépourvues d'un système de réparation efficace sont plus sensibles au agents génotoxiques que les souches normales. Les produits qui induisent une mortalité significativement plus forte chez les souches déficientes sont donc considérés comme génotoxiques.

Dans le test Pol A avec E. coli c'est l'enzyme Polymerase 1 qui est déficiente. Une souche Pol A^+et une souche Pol A^- sont exposées simultanément au produit. On compare leur degré respectif d'inhibition. Ce test peut être pratiqué sur milieu liquide solide ou comme "spot test".

souches:	E. coli W3110-P3478 Pol A^+ et Pol A^-
charge de travail:	1 personne
coûts:	en moyenne 500 $ par produit (évaluation trop faible)
temps:	3 à 4 semaines

référence: Hollstein M., J. McCann, F.A. Angelosanto, W.W. Nichols, 1979, Short Term tests for carcinogens and mutagens. Mutation res. 65, 133-226.

Brusick, D. et A. Auletta, 1985. Developmental status of bioassays in genetic toxicology. Mutation res. 153, 1-10.

référence originale: Slater E.E., M.D. Anderson et H.S. Rosenkranz. 1971. Rapid detection of mutagens and carcinogens. Cancer Res. 31. 970-973.

3.0 Tests cytogénétiques

Bien que la corrélation entre le pouvoir clastogène* et le pouvoir mutagène d'un agent soit d'ordre qualitatif plutôt que quantitatif, cette dernière est suffisamment forte pour que les agents clastogènes, donc capables d'induire des aberrations, soient considérés comme des mutagènes potentiels.

Les tests suivants visent à évaluer la capacité d'un agent à induire in vivo et in vitro des aberrations chromosomiques.

référence: Hollstein M. et J. McCann, F.S. Angelosanto, W.W. Nichols, 1979. Short term test for carcinogens and mutagens. Mutation res. 65, 133-226.

3.1 Tests cytogénétiques in vitro

3.1 a) Recombinaisons mitotiques avec Saccharomyces cerevisiae

- conversions mitotiques

* Agents provoquant des aberrations chromosomiques.

Une conversion mitotique est un transfert unilatéral d'une séquence de nucléotides entre deux chromatides de deux chromosomes homologues. La fréquence de conversion augmente de manière significative lorsque des cellules sont exposées à un agent mutagène.

On peut observer ce phénomène chez des cellules diploides hétéroalléliques porteuses de deux allèles défectueux pour un même locus. La conversion d'une séquence contenant l'allèle mutant restaure le génotype original (sauvage) sur un des deux chromosomes. Les allèles "sauvages" sont généralement dominants sur les allèles mutants. Les cellules filles qui hériteront de l'allèle sauvage peuvent être identifiées par leur capacité à croître sur un milieu sélectif.

souches:	Saccharomyces cerevisiae D4, hétéroallélique aux loci trp5, ade 2-1/ade 2-1/a de 2-2, Trp5 -12/trp5-27).
charge de travail:	1 personne à temps plein + 1 aide occasionnelle
coût:	2 000 $
temps minimum:	12 jours.

- "crossing-over" mitotique

Chez S. cerevisiae, l'allèle ade 2-40 provoque un besoin absolu d'adenine et sur un milieu qui en contient toutes les colonies d'homozygotes sont rouges. L'allèle ade-119 provoque un besoin partiel et les cellules homozygotes forment des colonies roses. La combinaison des deux allèles a pour effet de rendre la cellule prototrophe pour l'adenine et sur un milieu qui en contient toutes les colonies sont blanches.

Chez une souche hétéroallélique un crossing-over entre le centromère et le locus ade 2 conduit dans 50% des cas à la ségrégation de noyeaux-fils

homoalléliques pour l'un et l'autre des alèlles et à la formation de colonies moitié rouges moitié blanches.

souches:	Saccharomyces cerevisiae D5 (ade 2-40/ade 2-119)
charge de travail:	1 personne à temps plein + 1 aide occasionnelle
coût:	1 000 $
temps:	minimum 10 jours
référence:	Zimmerman F.K., 1977. (déjà cité).
références originales:	Zimmerman F.K., 1973. A yeast strain for visual screening for the two reciprocal products of mitotic crossing-over, Mutation res. 21, 263-269.
	Zimmerman F.K. et R. Schwaier 1967. Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid. I methyl-3-nitro-1- nitrosoguanidine and other alkylating agents in Saccharomyces cerevisiae, Mol. Gen. Genet. 100. 63-76.

3.1 b) Test cytogénétique de leucocytes chez un hôte

On décompte les abberrations chromosomiques à l'aide du microscope sur une population de leucocytes périphériques humains. Ces derniers ayant été préalablement exposés, via un animal hôte, au produit testé.

Des leucocytes périphériques humains sont isolés à partir du sang veineux et placés dans des chambres à diffusion. Chaque chambre est introduite dans la cavité péritonéale d'un animal hôte. On administre à ce

dernier le produit testé. Après un temps donné, les animaux sont sacrifiés et les chambres récupérées. On isole les cellules et on les fixe sur des lames. On procède alors au décompte des abberations chromosomiques.

animaux: souris, hamster chinois

charge de travail: 1 personne (expertise nécessaire)

coût: -

temps: minimum 5 jours

référence originale: Bachten K.E. et P. Nettesheim: In vitro and in vivo culture of mouse peripheral blood for chromosome aberrations. Proc. Soc. Exptl. Prod. Med 128 1106-1110.

références: Brewen J.G. 1977. Host mediated cytogenetic assay. In Kilbey B.S., M. Legator, W.W. Nichols, C. Ramel (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Elsevier, Amsterdam. p. 221-224.

3.1 c) Échanges entre chromatides soeurs (S.C.E.)

Les échanges symétriques de segments d'ADN entre chromatides soeurs (S.C.E.) à des loci homologues ne produisent pas d'altérations morphologiques des chromosomes. Ils sont cependant un indice des dommages et de l'intensité de la réparation subits par l'ADN. Les S.C.E. peuvent être identifiés et denombrés au microscope par des techniques simples de coloration.

Les cellules sont cultivées en présence de 5-bromodeoxyuridine (BrdU), une base analogue, pendant une période couvrant au moins deux cycles cellulaires. À la métaphase suivante il est possible de distinguer les deux chromatides entre elles, l'une d'elles étant composée de deux brins d'ADN substitués avec le BrdU alors que l'autre est composé d'un brin substitué et d'un brin normal. Les deux chromatides prennent une teinte différente lorsqu'elles sont colorées au Giemsa ou avec une teinture fluorescente le produit est ajouté directement au milieu de culture. Les chromatides qui ont subi des échanges présentent une alternance de régions claires et de régions plus foncées.

souches:	cellules de hamster chinois
	lymphocytes humains
coûts	6 000 $ par produit
temps:	4 à 6 semaines
Référence:	Samuel, A.L., J.W. Allen, W.E. Rogers, L.A. Juergens. 1977. In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange formation. In (Kilbey, B.J. et al (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Elsevier Scientific Pu. Co., Amsterman, p. 275-291.
	Hollstein, M., J. McCann., F.A. Angelosanto, W.W. Nichols. 1979. Shorterm Tests for carcinogens and mutagens. Mutation res. 65: 133-226.
Référence originale	Latt, S.A. 1974. Sister chromatid exchanges indices of human chromosome damage and repair.

Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 71, 3162-3166.

coûts Brusick, D., A. Auletta, 1985. Developmental status of bioassays in genetic toxicology. Mutation res. 153, 7 à 10.

3.2 Tests cytogénétiques in vivo

3.2 a) Test du micronoyau

Pendant l'anaphase les chromosomes acentriques et les fragments chromosomiques ne migrent pas vers les pôles du fuseau comme le font les chromosomes et les segments centriques qui sont incorporés dans les noyaux des cellules filles à la télophase. Les chromosomes et les segments acentriques sont aussi incorporés dans les cellules filles mais sous forme de corps nucléaires secondaires plus petits appelés micronoyaux.

Le décompte des cellules contenant des micronoyaux se fait particulièrement bien chez les érythrocytes de la moelle osseuse. Quelques heures après leur dernière mitose les érythroblastes expulsent leur noyau. Alors que les micronoyaux demeurent dans la cellule. Les erythrocytes ayant retenu un micronoyau se reconnaissent facilement. De plus la coloration des cellules permet de distinguer entre les jeunes érythrocytes (moins de 24 heures) et les érythrocytes plus âgés. En limitant le décompte des cellules contenant des micronoyaux à la population des jeunes érythrocytes on s'assure que les anomalies dénombrées sont survenues à la mitose précédente sous l'influence temporaire du produit testé.

On administre à l'animal la dose voulue du produit testé. Après une période suffisante pour que se produise un minimum de deux cycles

cellulaires (30 heures), l'animal est sacrifié. On extrait la moëlle osseuse des deux fémures et on isole les cellules par centrifugation. Les cellules sont fixées et colorées. On procède au décompte des érythrocytes contenant ou non des micronoyaux.

animaux:	jeunes souris ou rat de 7 à 12 semaines 5 par dose
charge de travail:	1 personne
coût:	en moyenne 8 000 $ par produit avec souris, 9 000 avec rats
temps:	manipulation minimum 1 semaine (10 à 12 semaines pour tester un produit).

références:	Schmid. W. 1977. The micronucleus test In Kilbey B.S., M. Legator, W.W. Nichols, C. Ramel (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Elsevier, Amsterdam. p. 235-242.
référence originale:	Schmid W., D.T. Arakaki, N.A. Bresleau et J.C. Culbertson. 1971. Chemical mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system 1. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology obtained with alkilating agents. Human genetik. 11, 103-118.

3.2 b) Analyse en métaphase des cellules de la moëlle osseuse

La procédure de ce test est semblable a celle du test précédent. Cependant les aberrations chromosomiques sont dénombrées au niveau de l'ensemble des cellules en métaphase.

Les aberrations chromosomiques sont plus facilement observables en métaphase, au moment où les chromosomes sont contractés Elles peuvent être de type chromosomique, chromatide ou échange entre chromatides-soeurs. Elles regroupent les délétions, inversions, duplications, anneaux centriques ou accentriques etc...

Des techniques de colorations permettent de faire ressortir les bandes caractéristiques de chaque chromosome et facilitent la détection des anomalies chromosomiques.

animaux:	rats ou souris - hamster chinois
charge de travail:	-
coût:	23 000 $par produit selon l'animal
temps:	8 à 22 semaines.

référence: Evans, H.J. 1976. Cytological methods for detecting Chemical Mutagens, In Hollaender A. (Ed.) Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection vol 4 p. 1-29. Plenum press. N.Y.

coûts et temps: Brusich D et A. Auletta, 1985. Developmental status of bioassays in genetic toxicology. Mutation res. 153, 1-10.

3.2 c) Translocations héréditaires chez les mammifères mâles

Ce test permet d'évaluer le potentiel clastogène (production d'aberrations chromosomiques) et mutagène d'un produit au niveau des cellules germinales. L'expression translocation réciproque fait référence à

l'échange de segments terminaux entre chromo somes non homologues. Ces échanges donnent lieu à des appariements spéciaux lors de la méiose 1 et à des configurations qui diffèrent de la configuration bivalente des chromosomes normaux. Ces configurations peuvent être identifiées et dénombrées au microscope.

On emploie pour ce test des souris. Les 40 chromosomes de la souris sont acrocentriques et forment normalement des configurations méiotiques simples. Il est plus facile d'y identifier les figures produites par les translocations que chez le rat ou le hamster. Pour que les translocations induites après la méiose soient détectées il faut que le test soit poursuivi jusqu'à la deuxième génération (F1).

- Analyse des spermatocytes de males traités

On administre le produit à l'animal. Après un délai suffisant pour que les spermatogonies aient le temps de se différencier en spermatocytes (50 à 100 par jour) les mâles sont sacrifiés. Les cellules sont isolées, fixées et colorées. On dénombre les spermatocytes à la méiose qui montrent des configurations anormales.

-Test de translocation F1

Des jeunes mâles sont traités le matin et mis en cage avec des femelles vierges l'après-midi. Les femelles sont remplacées tous les sept jours pour évaluer la sensibilité des différents stades de différenciation des cellules germinales (spermatozoïdes, spermatides, spermatocytes). Les mâles de la génération F1 sont sacrifiés à maturité. Le dénombrement des anomalies se fait au niveau des spermatocytes.

animaux:	souris mâles de 7 à 12 semaines (10 à 25 par concentration)
charge de travail:	1 personne
coût:	(10 000 $)
temps:	6 mois

référence: Leonard, A. 1977. Tests for heritable translocations in male mammals In Kilbey B.J., M. Legator, W.W. Nichols, C. Ramel (Eds.) "Handbook of Mutagenicity Test Procedures". Elsevier, Amsterdam. p. 293-299

4.0 Test de mutagenicité par transformation In vitro

4.1 Avec cellules embryonnaire de hamster syrien

On observe dans des cultures de cellules embryonnaires de hamster, exposées au préalable à un agent cancérogène, des colonies de cellules dites transformées. Ces colonies sont caractérisées par un patron de croissance désordonné en trois dimensions qui contraste avec le patron normal de croissance. Ces cellules ont acquis la capacité de former des colonies sur un agar semi-solide. Lorsqu'elles sont injectées à des hamsters elles génèrent des tumeurs et des sarcomes. La présence de ces colonies transformées est un indice que le produit testé est cancérogène.

Les cellules sont isolées à partir d'embryons, préservées par cryoconservation et le moment venu, les échantillons sont sélectionnés pour leur capacité à être transformés sous l'influence d'un cancérogène connu. Après avoir été remises en cultures, les cellules sont exposées au produit. Pour le dénombrement elles sont colorées au Giemsa. Les colonies transformées sont reconnues à leur patron de croissance.

Dans des tests semblables utilisant d'autres types de cellules, les colonies transformées peuvent être identifiées par leur capacité à croître sur un agar semi-solide ou parce qu'elles forment des foyers sur une couche mono-cellulaire.

souches:	cellules embryonnaires de hamster syrien ou de rat ou lignées de cellules: souris C3H10T1/2 C1 8 hamster BHK21 C1 13, souris Balb 3T3
charge de travail:	1 personne
coûts:	7 000 $ (sous estimé)
temps:	2 semaines pour les cellules obtenues à partir d'embryons 2 à 6 semaines pour les lignées de cellules.
référence:	Pierta, J.R. 1980. Transformation of Syrian Hamster Embryo Cells by diverse chemicals and Correlation with their reported carcinogenic and mutagenic activities In De Serres F.S. et A. Hollaender (Eds) "Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection" Vol. 6 p 175-202 Plenum press. New York.
référence originale:	Berwald Y. et L. Sach. In vitro transformation with chemical carcinogens. Nature (London) 200, 1183-1184

5.0 Test de mutagenicité in vivo

5.1 avec mammifères

5.1 a) Mutation létale dominante chez la souris mâle

Une mutation létale dominante à l'intérieur de l'ADN d'une gamète entraine à court terme la mort du zygote issu de cette gamète. Il est difficile d'évaluer le nombre d'oeufs morts avant l'implantation dans l'utérus, on suppose donc qu'il y a corrélation entre ceux-ci et ceux qui meurent immédiatement après l'implantation.

Il est possible de dénombrer ces derniers à partir du nombre de déciduum. Le déciduum est une excroissance du tissu utérin maternel stimulée par chacun des oeufs au moment de l'implantation. Même après la mort de l'oeuf le déciduum continu de croître jusqu'à la onzième journée et reste présent jusqu'à la fin de la grosesse.

Les souris mâles sont traitées avec l'agent testé et accouplées à des femelles vierges à différentes périodes correspondant aux différentes étapes de la spermatogénèse. Le nombre de morts post-implantation est compilé en fonction du nombre total d'implantations. Pour ce faire les femelles sont sacrifiées 17 jours après avoir été accouplées aux mâles.

animaux:	souris (25 mâles et 525 femelles. 10 mâles par concentration, 10 pour contrôle négatif, 5 pour contrôle positif. 3 femelles/mâles/semaines pendant 8 semaines.
charge de travail:	au total 87 heures de dissection
coûts:	27 000 $

temps 10 à 12 semaines

références: Bateman A.J. The dominant lethal assay in the male mouse. In Kilbey B.S., M. Legator, W. Nichols et C. Ramel (Eds.) p. 325 à 334.

références originales: Kaplan, W.R. et M.F. Lyon 1953. Failure of mercapto to ethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation II. Experiments with mice. Science 118, 777-778

Bateman A.J. 1966. Testing chemicals for mutagenicity in a mammal. Nature 210, 205-206.

5.2 Test de mutagénicité in vivo avec Drosophile

5.2. a) Mutation létale dominante

Ce test permet de dénombrer les mutations létales dominantes chez la progéniture de Drosophiles mâles exposés à un agent. Les oeufs fertilisés sont incubés. On évalue le nombre total d'individus, le nombre d'individus morts dans les premières heures de développement embryonnaire (oeufs blancs) et de morts plus tardives (oeufs bruns). Pour que la mortalité puisse être attribuée à des dommages chromosomiques, il faut que les taux de mortalité des deux stades soient plus élevés que chez des groupes témoins.

Il existe un deuxième test qui permet d'attribuer d'une manière plus sûre la mortalité des oeufs aux dommages chromosomiques. Ce test part du principe que la quantité de sites endommagés est fonction de la quantité de matériel génétique contenu dans la cellule.

Il est possible d'obtenir des souches de Drosophile dont les mâles produisent des gamètes qui ne contiennent pas la même quantité de matériel génétique. Ces mâles (XY/0) sont exposés au produit à tester et croisés avec des femelles (X/X). On obtient à la F1 des femelles XY/X et des mâles X/0. Si la mortalité des oeufs est due à des altérations chromosomiques, elle devrait être significativement plus élevée chez les femelles qui possèdent, relativement aux mâles plus de matériel génétique. Les taux de mortalité sont calculés à partir du nombre de survivants de chaque sexe chez un groupe de mouches traitées et chez un groupe témoin.

souche:	Drosophila melanogaster
charge de travail:	-
coût:	-
temps	-

5.2 b) Mutation récessive létale liée au chromosome sexuel (X) (SLRL)

Ce test permet de détecter les altérations chromosomiques létales et récessives situées sur le chromosome X. Des mâles (P1) sont traités puis accouplés à des femelles non traitées. Toutes les femelles de la génération F1 héritent du chromosome X traité et le transmettent à la moitié de leur progéniture mâle (F2). Les mâles de la génération F2 qui héritent de ce chromosome ne pourront survivre si ce dernier est porteur d'une mutation létale.

Le test est mené de manière à ce qu'on obtienne deux classes phénotypiques différentes de mâles à la F2, une d'entre elles est associées

au chromosome X traité. Si cette classe est absente au stade adulte, la mortalité peut être attribuée aux altératons induites sur le chromosome X par l'exposition au produit testé.

souches Basc test: P1 mâles souche sauvage (Orégon K)

P. femelles: Homozygotes Basc Lh (1) $sc^{sil}SC^{8R}$ + $S.Sc^{S1}SC^{8}w^{2}B$

Yellow Bar test: P1 yB/Y+Y

P1- Oster In (1) sc $^{S1L}SC^{8R}$ + Dl-49,Y $SC^{1}SC^{8}$

charge de travail: 2 techniciens + 1 aide

coût: 20 000 $

temps: 10 à 14 semaines

5.2 c) Perte d'un chromosome - (X ou Y)

La perte d'un chromosome est une indication qu'il y a eu bris chromosomique non suivi d'une restitution ou d'un rejoignement. C'est un événement rare, mais il est facile d'en faire le décompte si on utilise les souches yB/y+Y et Oster (yellow Bar test) dans le test par les mutations létales récessives.

Lorsqu'on utilise ces marqueurs génétiques (Yellow Bar) la perte d'un chromosome sexuel chez les mâles traités se traduit par l'apparition à la F1 de mâles jaunes. La non disjonction spontannée des chromosomes sexuels produit le même phénotype. Pour connaître les proportions respectives de non disjonctions et de pertes d'un chromosome il faut soustraire du nombre total de mâles jaunes les femelles produites aussi par non disjonction.

souches, temps, coût: se fait en parallèle au Test (SLRL-5.2 b)

5.2 d) Test pour détecter les translocations héréditaires

La capacité qu'a un agent d'induire des translocations est liée à sa capacité de produire des bris chromosomiques. Les marqueurs génétiques utilisés dans ce test permettent d'obtenir quatre classes phénotypiques à la génération F2. Si des translocations ont lieu entre le 2ième et 3ième chromosomes des mâles de la génération P1, deux de ces classes ne sont pas viables.

Les dommages chimiques causés par un mutagène peuvent demeurés latents pendant plusieurs générations cellulaires avant de s'exprimer sous forme de bris ou de mutation. Si le sperme est emmagasiné dans la femelle un certain temps avant la fertilisation la probabilité d'apparition des translocations augmente. Pour ce faire les femelles sont gardées dans un milieu dépourvu de levure.

souches:	P1 mâles (souche sauvage pour la couleur des yeux)
	P1 et P2 femelles Oster bw; stp^{p}
charge de travail:	-
coût:	-
temps:	-

référence: Worgler F.E., F.H. Sohols et E. Vogel, 1977. Drosophila as assay system for detecting genetic changes In Kilbey B.J., M. Legator, W. Nichols et C. Ramel. "Handbook of Mutagenicity Tests Procedures". Elsevier, Amsterdam. p. 335-373

référence originale: Sobels F.H. 1972. The role of Drosophila in the field of mutation research, Arch. Gene., 45, 101.125.

6.0 Test de carcinogénicité rapide in vivo

Il existe un certain nombre de tests permettant de vérifier rapidement la production in vivo de foyers de cellules cancéreuses chez des animaux exposés à un agent cancérogène. Aucune corrélation n'a cependant encore été établie entre les résultats de ces tests et la cancérogénicité des produits testés.

6.1 Test de production de foyers prénéoplasiques sur le foie de rat

Ce test est basé sur la présence de foyer prénéoplasique et de nodules hyperplasiques au niveau du foie de rats préalablement exposés au produit testé. Les foyers prénéoplasiques sont des agrégats de cellules présentant des fonctions enzymatiques à des constituants cellulaires altérés. Il est possible de dénomber ces foyers par un examen histochimique alors que les nodules hyperplasiques se présentent comme des taches grisâtres contrastant avec la couleur rouge-brun du foie.

Jusqu'à présent l'accumulation de données tend à soutenir la relation entre les foyers prénéoplasiques, les nodules hyperplasiques et les tumeurs cancéreuses. Cependant tous les foyers et nodules ne mènent pas à la formation de tumeurs cancéreuses.

Pour augmenter la sensibilité et la rapidité du test on a recours à deux procédés soit la cocarcinogénicité et la promotion. Un cocarcinogène est un agent ou un procédé qui augmente la réponse carcinogène d'un animal sans toutefois être lui-même carcinogène. L'hépatectomie partielle et l'utilisation de rats nouveaux-nés sont suggérés ici par les auteurs.

Un promoteur est un agent ou un procédé qui accélère le processus qui conduit à la transformation des foyers et des nodules en tumeurs cancéreuses. L'administration ad libidum de phénobarbital a été retenue pour ce protocole.

Ce dernier peut prendre l'allure suivante: hépatectomie partielle suivie 18 ou 24 heures plus tard de l'administration du produit. L'administration du phénobarbital ad libidum débute 6 jours après celle du produit et se poursuit pendant 7 semaines, après quoi les rats sont sacrifiés, on procède alors au décompte des foyers prénéoplasiques

Coût:	-
Temps:	-
Charge de travail:	-
Avantages:	Test in vivo sensible et rapide, beaucoup moins coûteux que l'exposition à vie.
Désavantages:	Requiert une expertise. n'est pas encore validé encore au stade expérimental
Références:	Paleira, M.A. 1982. Rat liver foci bioassay. J. Am. Coll Toxicol. 101 101-117.
Référence originale:	Peraino, C., R.J.M. Fry, et E. Staffeldt. 1971. Production and enhancement by phenobarbital of hepalocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene Canc. res. 31, 1506-1512.

6.1.b Test d'initiation/promotion de cancer de peau chez souris Sencar.

Ce test repose sur la corrélation qui existe chez la souris entre le nombre de papillomes bénins induits par un agent et l'incidence, après une période de latence plus longue, de tumeurs malignes. L'utilisation d'une souche de souris particulièrement sujettes au cancer de la peau (souris Sencar) permet de rendre le test plus sensible.

Il est possible selon le protocole choisi, d'établir si un produit est un initiateur, un promoteur ou un carcinogènes complet. L'initiation fait référence au processus qui conduit à l'altération irréversible d'une cellule pouvant conduire au cancer, alors que la promotion fait référence au processus réversible qui accélère la progression de la cellule altérée vers la tumeur cancéreuse. Un carcirénogène complet soit à la fois comme initiateur et promoteur.

Si le produit est testé comme carcinogène complet il est administré seul, sur une période de vingt semaines. Si il est testé comme initiateur, il est administré au tout début du test, son administration est suivie de celle d'un promoteur connu, cette dernière se prolongeant sur une vingtaine de semaines. Si il est testé comme promoteur, on administre alors à la souris un initiateur connu et le produit est administré pendant les vingt semaines suivantes. Tout au long du test on note chez les sujets l'apparition et la disparition des papillomes et carcinomes. Le produit peut être administré par voie cutanée ou sous-cutanée.

Coût:	-
Temps:	-
Charge de travail:	-
Avantages:	-Test in vivo rapide et sensible
Désavantages:	-encore au stade expérimental -spécificité de certains produits pour certains organes.
Références:	Slaga, T.J., S.M. Fisher, L.L. Triplett et S. Nesnav. 1982. Comparison of complete carcinogenesis and tumor initiation and promotion in mouse skin: the induction of papillomas by tumor initiation-promotion a reliable short term assay. J. Am.Coll. Toxicol. Vol. 1, p. 83 à 99.

ANNEXE 3

CARACTÉRISTIQUES DES RÉSINES XAD

L'annexe 3 décrit les caractéristiques techniques des résines XAD et en particulier de la résine XAD-2. L'information est tirée du "Technical bulletin fluid process chemicals" publié par la compagnie Rohm and Haas en 1978.

technical bulletin
fluid process
chemicals

Summary Bulletin Amberlite® Polymeric Adsorbents

Amberlite polymeric adsorbents

Amberlite polymeric adsorbents are hard, polymerized copolymer heads which are insoluble and which have high porosity and high surface area. They are provided in a nominal mesh size of 20-60 and are available in a variety of polarities and surface characteristics. This range of surfaces allows Amberlite polymeric adsorbents to be used in a wide range of adsorption applications. The nonpolar adsorbents are particularly effective for adsorbing nonpolar solutes from polar solvents. The adsorbents of intermediate polarity are often able to exhibit both types of behavior, that is adsorbing nonpolar solutes from polar solvents, as well as adsorbing polar solutes from nonpolar solvents.

Amberlite polymeric adsorbent resins are now being used commercially to remove and/or recover phenolics, chlorinated pesticides, antibiotics, grease, organic nitrogen and various aromatic compounds from aqueous streams. In addition, these resins are also being used to remove various organics from hydrogen peroxide and color bodies from alkanol amines.

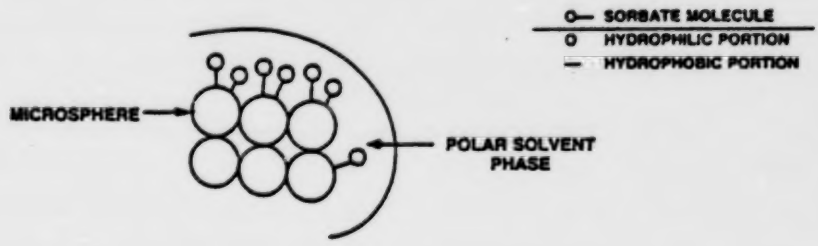
Amberlite XAD-2 and XAD-4 are being used in sensitive analytical procedures to detect, identify and measure the presence of pesticides and other organics in the environment. They are also used to detect narcotics in blood and urine. These resins are employed to concentrate organics for further analysis by gas chromatography and other methods.

In addition, specially purified polymeric adsorbents are used for treating "drug overdose" victims throughout the world. This method involves passing the blood of the person being treated through a cartridge

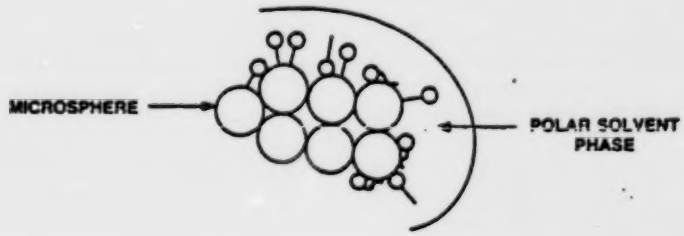
© Rohm and Haas Company, 1978

figure 1

SORPTION ON AROMATIC SORBENTS FROM POLAR SOLUTIONS



SORPTION ON ALIPHATIC SORBENTS FROM POLAR SOLUTIONS



SORPTION ON ALIPHATIC SORBENTS FROM NONPOLAR SOLVENTS

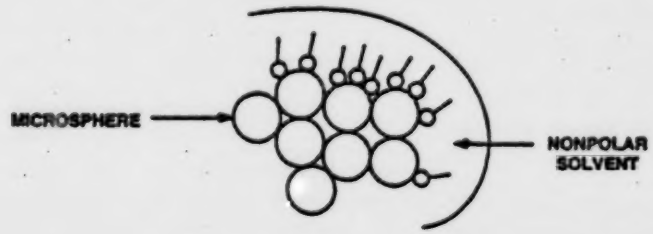


table I—typical properties of Amberlite polymeric adsorbents

Chemical Nature	Porosity Volume %	True Wet Density grams/cc	Surface Area m^2/gram	Average Pore Dia. Angstroms	Skeletal Density grams/cc	Nominal Mesh Sizes
Nonpolar						
XAD-2 Polystyrene	42	1.02	300	90	1.07	20 to 60
XAD-4 Polystyrene	45	1.02	725	50	1.08	20 to 60
Intermediate Polarity						
XAD-7 Acrylic Ester	55	1.05	450	90	1.24	20 to 60
XAD-8 Acrylic Ester	52	1.09	160	225	1.23	25 to 60

containing the resin. Amberlite polymeric adsorbent resins will adsorb the drug molecules from the plasma.

Proprietary technology and patents of Rohm and Haas Company have been licensed in this field.

The physical properties of the Amberlite adsorbents are summarized in Table I.

adsorption with Amberlite polymeric adsorbents

The most significant feature of Amberlite adsorbents is the nature of their different surfaces. The phenomenon of adsorption onto solids involves van der Waals' forces which bind the sorbate to a solid surface. Many types of interaction such as hydrophobic bonding, dipole-dipole interaction and hydrogen bonding are important. It is not possible to predict accurately just which materials will be adsorbed well by a given adsorbent. However, the general concept that hydrophobic or nonpolar molecules or portions of molecules are attracted to hydrophobic surfaces and hydrophilic or polar materials to hydrophilic or polar surfaces is a useful concept. The pictorial views of these interactions which are presented in Figure 1 may be helpful.

If each organic molecule is thought of as having both a hydrophobic and a hydrophilic end, then the hydrophobic end will be attracted to hydrophobic adsorbents such as Amberlite XAD-2 and Amberlite XAD-4. This is particularly true when the adsorption takes place from aqueous solution.

Adsorbents of intermediate polarity or hydrophilicity such as Amberlite XAD-7 and Amberlite XAD-8 can have an attraction for either the hydrophobic or the hydrophilic end of a molecule. Thus, cases will be found where these adsorbents will function well both in adsorbing hydrophobic materials from water and hydrophilic materials from non-aqueous systems. For example, Amberlite XAD-7 is able to adsorb phenol, a moderately polar molecule, from either water or hexane with the adsorption taking place by association with the hydrophobic benzene ring during adsorption from water and the hydrophilic hydroxyl moiety during adsorption from hexane.

The above described concepts, while useful, serve only as a guide and exceptions may well be found. Since one may not be able to predict the exact mechanism of adsorption, laboratory studies are encouraged to permit evaluation of any separation.

table II—inherent dipole moments of functional groups

Adsorbents	Dipole Moments
XAD-2, XAD-4	0.3
XAD-7, XAD-8	1.8

table III—regeneration of adsorbents*

1. Methanol or other organic solvents — often most effective.
2. Base — For weak acids.
3. Acid — For weak bases.
4. Water — Where adsorption is from an ionic solution.
5. Hot water or steam — For volatile materials.

ease of regeneration

The principal difference between the adsorption properties of Amberlite polymeric adsorbents and activated carbon is the lower binding affinities of the former adsorbents. Whereas binding by activated carbon is often irreversible, regeneration of the Amberlite adsorbents with acids, bases or water-miscible organic solvents is quite efficient. This permits long-term cyclic operation in the isolation, separation and purification of organic components from many types of streams. Because of the highly crosslinked nature of the polymeric adsorbents, these resins have excellent physical durability and negligible attrition losses are encountered in column operations.

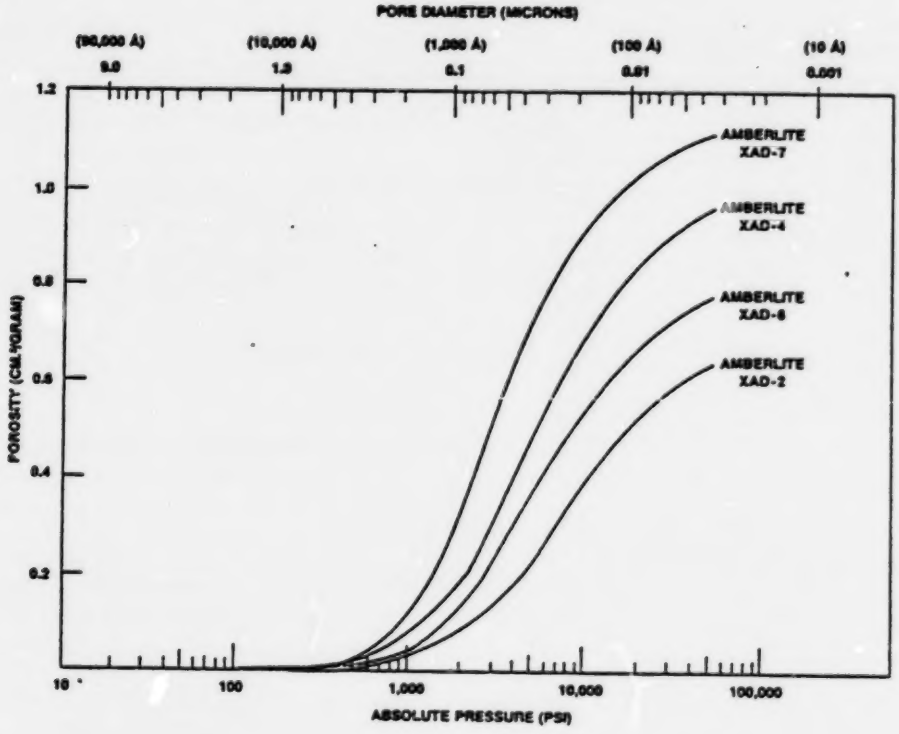
polarity, pore size and surface area

One way of categorizing the Amberlite adsorbents in terms of polarity is by means of the dipole moment associated with the surface. Dipole moments of simple molecules which contain groups present in the Amberlite adsorbents are presented in Table II.

A second important characteristic of adsorbents is their pore size. Here the concept is simply that the adsorbent must possess pores of a diameter sufficient so that the material to be adsorbed can migrate through the pore to the adsorbing surface. It should be noted that the pore size data were obtained on dry samples of the adsorbents and the pore distribution may be somewhat different in the solvated state. It should also be emphasized that the number given is the average pore size and that each adsorbent will possess pores of a range of sizes, as is demonstrated in Figure 2, and consequently, may adsorb considerably larger molecules than indicated by the average value.

A third important property of an adsorbent is its surface area. For adsorbents of equal porosity, the amount of solute that theoretically can be adsorbed increases with increasing surface area. There is an inverse relationship between surface area and pore size with the smaller pore size adsorbents having the greater surface area. Thus, as indicated previously, pore size is an important consideration in choosing an adsorbent

figure 2—pore distributions of some Amberlite adsorbents as determined by mercury intrusion



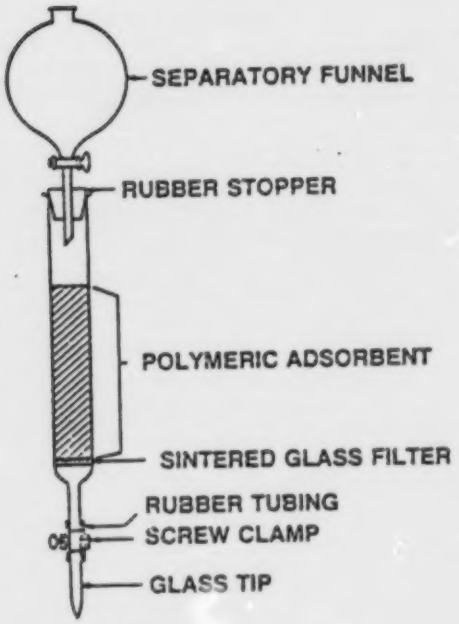
for a particular separation. An illustration of this point is found in the observation that for a small molecule such as phenol Amberlite XAD-4 has a much higher capacity than Amberlite XAD-2 whereas for a larger molecule such as an alkylbenzene sulfonate Amberlite XAD-2 has a much higher capacity than Amberlite XAD-4.

selecting a regenerant

In order to use an adsorbent effectively, it is necessary to remove the adsorbed material by elution. This can be accomplished in a number of ways as is summarized in Table III. For most adsorbents, a proper organic solvent is effective. It should be one which is a good solvent for the adsorbed material and which interacts with the surface of the adsorbent. In many cases, methanol and acetone have proved to be good eluants, and also have the advantage of being low cost solvents.

Whenever ionic or potentially ionic materials are involved, it is generally true that the solute will be much more strongly adsorbed in the nonionic than in the ionic form. Thus, acidic materials are best adsorbed from acid solution where they are not ionized and are often eluted well with base which ionizes the acidic groups. Conversely, basic materials are best adsorbed from basic solution and eluted with acid.

figure 3—adsorbent column



Other special techniques may find utility in special cases. If a material is adsorbed from a solution with a high salt background, it may sometimes be eluted with plain water. Steam may be an effective eluant if one is dealing with a volatile material.

laboratory column procedure

experimental

Adsorption applications using Amberlite adsorbents may be carried out by either column or batch techniques. Column operations are usually preferable although the choice of methods depends entirely upon the application in question.

In the treatment of most solutions, the polymeric adsorbent is used in a vertical column to form an adsorption bed. The solution to be treated is allowed to flow through the column until a target end point is reached. At this point, the adsorbent is regenerated to prepare it for another cycle.

An adsorption column may be viewed as a series of equilibrium systems, much like the theoretical plates of distillation theory. As the solution proceeds down the column, the adsorption reaction is continuously driven in the forward direction by the equilibrium requirements of each new theoretical plate encountered.

Various devices may be used for adsorption columns (Figure 3). An ordinary laboratory burette can be used by inserting a small plug of glass wool in the restriction above the stopcock. More permanent columns may be made from glass tubes of various diameters by fusing into the tube a sintered glass filter, and drawing down the tube at the bottom.

Almost any convenient vessel can be used to hold the stock or regenerant solutions as it is attached to the top of the column with a suitable delivery tube and provided with a flow control device such as a screw clamp. The reservior should always be placed higher than the top of the column and the attachment to the column should be air tight. Separatory funnels are very useful and easy to use since they contain a stopcock which can be used to open and close the flow, and can be set into the top of the column by means of a rubber stopper.

The bed depth of the adsorbent should be maintained at a minimum of 18 inches (0.46 m) with greater depth being even more desirable. The size of the column should be chosen so the resin only fills about ½ of the column. This will allow the backwashing procedure to be carried out properly as discussed below.

preparation of laboratory columns

Some precaution should be kept in mind whenever a column operation is to be used. Always fully hydrate the Amberlite polymeric adsorbent resin before charging it to the column and make certain the column already contains some water. Never allow a column to become dry. During the course of an experiment be sure to maintain the liquid level at least 1 inch over the bed. If it is necessary to interrupt the column run be sure to shut off both influent and effluent valves and keep the resin completely submerged.

preparation of the resin

The Amberlite polymeric adsorbents are rinsed with a sodium chloride—sodium carbonate solution before packaging to control bacteria and mold growth during storage. These preservative agents and residual monomeric compounds still present in the pores should be rinsed from the column with water, and then with the regenerants, following the procedure that will be used in the process. If a solvent is used for the regeneration process, it should be washed from the column and the resin rehydrated with water so the solvent does not adversely affect the adsorption step.

Use of the Amberlite adsorbent resin in analytical procedures requires solvent washing to insure complete removal of the residual monomeric compounds—acetone and methanol are most commonly used.

charging the resin into the column

Deionized water should be used to transfer the Amberlite polymeric adsorbent resin to the column. The column itself should contain some water at the start of the operation, and the Amberlite polymeric adsorbent resin should be poured into the column as a water slurry, using a beaker or another vessel. The following steps should be followed in charging resins properly:

1. Add resin-water slurry as described above to a column containing some water.
2. Occasionally drain excess water through the bottom of the column.
3. Do not permit the liquid level to fall below the resin level.
4. Continue adding in this manner until all resin is transferred.
5. Do not fill columns above about half way.

backwashing

The following procedure frees the bed of entrapped air pockets, classifies the resin particles, rids the bed of resin fines and, in subsequent cycles, removes debris that may have collected in the bed when treating a turbid process stream:

1. Attach a water line to the bottom of the column.
2. Introduce deionized water upflow very slowly.
3. Increase the flow until the bed of resin expands approximately 100%.
4. Maintain this flow until all air pockets are removed and all the particles have achieved mobility. (Extremely small particles may be allowed to pass out of the column.) This step is most important and, if performed correctly, will result in good particle size classification with the smaller particles at the top, the larger ones at the bottom portion of the column.

5. Stop the flow of water and permit the resin to settle by gravity.
6. Adjust the liquid level to 1 inch or more above the top of the bed.

operation of the column

After the resin has been charged to the column, backwashed and settled correctly, and the liquid level adjusted, a measurement should be made of the resin volume in the column. It is most convenient to use pre-calibrated columns or burette-type columns because the volume can be read directly. The volume of resin under these conditions is termed a bed volume. It includes the void spaces between particles.

flow rates

Exhaustion Step — 2 to 12 bed volumes per hour.

Regeneration Step — 1 to 2 bed volumes per hour.

Rinse Step — The same as regeneration for two bed volumes. The first bed volume of rinse water should be applied at the regeneration flow rate since this actually represents the completion of regeneration.

NOTE: A simple way to measure flow rate is to periodically collect some of the effluent in a graduated cylinder while checking the time with a stop watch. With permanent columns flowmeters can be fitted into the effluent line.

volumes of solutions

Backwash Step — Use as much as required to achieve classification and removal of accumulated solids.

Regeneration Step — Use 4 bed volumes in typical systems. Smaller amounts can sometimes be used, especially when part of the spent regenerant can be used again. A regenerant eluate curve (concentration of sorbate in regenerant as a function of time) will describe the efficiency of regeneration.

Further information on the Amberlite polymeric adsorbents are available in the following technical bulletins:

product information

1. Amberlite XAD-2 — Technical Bulletin
2. Amberlite XAD-4 — Technical Bulletin
3. Amberlite XAD-7 — Technical Notes
4. Amberlite XAD-8 — Technical Notes

laboratory testing procedures

5. Laboratory Column Procedures for Testing Amberlite Polymeric Adsorbents

applications

6. Organic Removal and Recovery with Polymeric Adsorbents: Process Descriptions.
7. The Separation of Organic Chemicals from Water.
8. Decolorization of Kraft Pulp Bleaching Effluents Using Amberlite XAD-8 Polymeric Adsorbent.

The technical staff of the Fluid Process Chemicals Group, Industrial Chemicals Department, Rohm and Haas Company will be happy to discuss your application with you.

safe handling information

A Material Safety Data Sheet is available for all Amberlite XAD adsorbents. To obtain a copy contact your Rohm and Haas representative.

caution:

Acidic and basic regenerant solutions are corrosive and should be handled in a manner that will prevent eye and skin contact.

Nitric acid and other strong oxidizing agents can cause explosive type reactions when mixed with ion exchange resins. Proper design of process equipment to prevent rapid buildup of pressure is necessary if use of an oxidizing agent such as nitric acid is contemplated. Before using strong oxidizing agents in contact with ion exchange resins, consult sources knowledgeable in the handling of these materials.

caution

Swelling can occur during operations with the macroreticular polymeric adsorbents. Their structure and high surface areas can result in significant swelling, particularly when nonpolar solvents are employed for conditioning and elution. The swelling that occurs with the use of polymeric adsorbents in narrow glass columns can result in laboratory accidents.

Amberlite polymeric adsorbents are industrial grade products, and are not intended for use in analytical, therapeutic, diagnostic or pharmaceutical applications without extensive purification. Rohm and Haas Company does not guarantee the suitability or purity of Amberlite polymeric adsorbents for any specific use; it is the user's responsibility to establish the required purity and to purify the adsorbent appropriately.

patents and licenses

Rohm and Haas Company holds patents on the use of polymeric adsorbent resins for a variety of process applications. For example, adsorption processes employing polymeric adsorbent resins for certain dissolved organic solutes, including, but not limited to, phenol, nitrophenols, chlorinated phenols, other phenolics, aromatic esters, chlorinated pesticides, antibiotics and surfactants are covered by U.S. patents. Users of these materials for such purposes should obtain appropriate licenses from Rohm and Haas Company. Nonexclusive licenses with single payment, modest royalties are available.

AMBERLITE POLYMERIC ADSORBENTS LITERATURE REFERENCES

A. Basic Information

1. Gustafson, R. L. et al, "Adsorption of Organic Species by High Surface Area Styrene-Divinylbenzene Copolymers", *I&EC Product Research and Development*, Volume 7, pp 107-115, June 1968
2. Paleos, J., "Adsorption from Aqueous and Nonaqueous Solutions on Hydrophobic and Hydrophilic High Surface-Area Copolymers", *J. Colloid and Interface Science*, Volume 31, pp 7-18, September 1969
3. Gustafson, R. L., "Enrichment and/or Separation of an Organic Compound by Adsorption Processes", U.S. Patent 3,531,463 (September 29, 1970)
4. Burnham, A. K., Fritz, J. S., et al, "Identification and Estimation of Neutral Organic Contaminants in Potable Water", *Analytical Chemistry*, Volume 44, pp 139-142, January 1972
5. Albright, R. L., "Porous Polymers Based on Trimethylolpropane Trimethacrylate and Related Materials", U.S. Patent 3,663,467 (May 16, 1972)
6. Kennedy, D. C., "Macroreticular Polymeric Adsorbents", *I&EC Product Research and Development*, Volume 12, pp 56-61, March 1973
7. Junk, G. A. et al, "Use of Macroreticular Resins in the Analysis of Water for Trace Organic Contaminants", *Journal of Chromatography*, Volume 99, pp 745-762, 1974
8. Stevens, B. W. and Kerner, J. W., "Recovering Organic Materials from Wastewater", *Chemical Engineering*, pp 85-87, February 3, 1975
9. Vulliez-Sermet, P. R. E., and Fiorentino, E., "Adsorption Process" (Superloading an Adsorbent Resin), U.S. Patent 3,979,287 (September 7, 1976)
10. Fiorentino, E., "Adsorption Process" (Recovery of Excess Chemical Reactant Using An Adsorbent Resin), U.S. Patent 4,087,845 (January 10, 1978)

B. Phenolic Waste Control

11. Chesanov, M. G., Kunin, R., and McGarvey, F., "Sorption of Phenols by Anion Exchange Resins", *I&EC*, Volume 48, pp 305-309, February 1956
12. Grieser, M. D., and Pietrzyk, D. J., "Liquid Chromatography on a Porous Polystyrene-Divinylbenzene Support; Separation of Nitro- and Chlorophenols", *Analytical Chemistry*, Volume 45, pp 1348-1353, July 1973
13. Crook, E. H., et al, "Removal and Recovery of Phenols from Industrial Waste Effluents with AMBERLITE XAD Polymeric Adsorbents", *I&EC Product Research and Development*, Volume 14, pp 113-118, June 1975
14. Fox, C. R., "Remove and Recover Phenol", *Hydrocarbon Processing*, Volume 54, pp 109-111, July 1975

C. Pesticides and Toxic Chemical Control

15. Harvey, G. R., "Adsorption of Chlorinated Hydrocarbons from Seawater by a Crosslinked Polymer", *Woods Hole Oceanographic Institution Technical Report WHOI-72-86*, November 1972, (Unpublished Manuscript)
16. Kennedy, D. C., "Treatment of Effluent from Manufacture of Chlorinated Pesticides with a Synthetic, Polymeric Adsorbent, AMBERLITE XAD-4", *Environmental Science and Technology*, Volume 7, pp 138-141, February 1973
17. Musty, P. R. and Nickless, G., "Use of AMBERLITE XAD-4 for Extraction and Recovery of Chlorinated Insecticides and Polychlorinated Biphenyls from Water", *Journal of Chromatography*, Volume 89, pp 185-190 (1974)
18. Richard, J. J. and Fritz, J. S., "Adsorption of Chlorinated Pesticides from River Water Using Amberlite XAD-2 Resin", *Talanta*, Volume 21, pp 91-93 (1974)
19. Nony, C. R., et al, "Removal of Trace Levels of 2-Acetylaminofluorene from Wastewater", *The Science of the Total Environment*, Volume 4, pp 155-163 (1975)
20. Lawrence, J. and Tosine, H. M., "Adsorption of Polychlorinated Biphenyls from Aqueous Solutions and Sewage", *Environmental Science and Technology*, Volume 10, pp 381-383, April 1976
21. Kennedy, D. C. et al, "Functional Design of a Zero Discharge Wastewater Treatment System for the National Center for Toxicological Research", *Proceedings of Purdue Industrial Waste Conference*, Volume 31, May 6, 1976
22. Kennedy, D. C., "Separation of Organic Compounds by Adsorption Processes", U.S. Patent 4,042,498 (August 16, 1977)

D. Decolorization of Waste Effluents

23. Paleos, J., "Decolorization of Kraft Wood Pulp Bleach Effluents", U.S. Patent 3,652,407 (March 28, 1972)
24. Kennedy, D. C. and McConnell, L. R., "Decolorization of Kraft Mill Effluent", *Southern Pulp and Paper Manufacturer*, January 1974
25. Kennedy, D. C. et al, "Decolorizing Dye Wastes", *American Dyestuff Reporter*, August 1974
26. Hurwitz, M. J. et al, "Separation of Waste Dyestuffs by Adsorption Process", U.S. Patent 3,853,758 (December 10, 1974)
27. Rock, S. L. and Stevens, B. W., "Polymeric Adsorption—Ion Exchange Process for Decolorizing Dye Waste Streams", *Textile Chemist and Colorist*, Volume 7, #9, September 1975

E. Munitions Waste Control

28. Walsh, J. T., Chalk, R. C. and Merritt, C., "Application of Liquid Chromatography to Pollution Abatement Studies of Munitions Wastes", *Analytical Chemistry*, Volume 15, No. 7, June 1973
29. Andren, R. K., Nystrom, J. M. and Erickson, R. J., "Treatment of TNT Munitions Waste Waters Using Polymeric Adsorption Resins", *U.S. Army Natick Laboratories*, January 1975
30. Stevens, B. W., McDonnell, R. P., Andren, R. K. and Nystrom, J. M., "Explosives Removal from Munitions Wastewaters", *Proceedings of Purdue Industrial Waste Conference*, Volume 30, May 1975
31. Heck, R. P., "Munitions Plant Uses Adsorption in Wastewater Treatment", *Industrial Wastes*, March/April 1978, pp 35-39

F. Product Purification

32. Tindall, J. B., "Purification of Alkanol Amines", U.S. Patent 3,428,684 (February 18, 1969)
33. Thirion, P., "Purification of Aqueous Hydrogen Peroxide Solutions Containing Dissolved Organic Compound by Use of Nonionic Porous Resin", U.S. Patent 3,556,727 (January 19, 1971)
34. Murphy, C. F. et al, "Conversion of Deacetylcephalosporin C", *Tetrahedron Letters*, No. 16, pp 1585-1588 (1972)

G. Clinical Applications

35. Fujimoto, J. M. and Wang, R. I. H., "A Method of Identifying Narcotic Analgesics in Human Urine after Therapeutic Doses", *Toxicology and Applied Pharmacology, 16*, pp 2821-2829, 1970
36. Weissman, N. et al, "Screening Method for Detection of Drugs of Abuse in Human Urine", *Clinical Chemistry*, Volume 17, pp 875-881, 1971

37. Rosenbaum, J. L., "The Use of Resin Hemoperfusion in the Treatment of Acute Drug Intoxication", *Clinical Toxicology*, Volume 5, pp 331-335, 1972

38. Bastos, M. L. et al, "Routine Identification of Drugs of Abuse in Human Urine", *J. Chromatography*, Volume 91, p 93 (1973)

39. Kullberg, M. P. and Gorodetsky, C. W., "Studies on the Use of Amberlite XAD-2 Resin for Detection of Abused Drugs in Urine", *Clinical Chemistry*, Volume 20, pp 177-183, 1974

H. Vapor Phase Applications

40. Kennedy, D. C., "Abatement of Air Pollution From Organic Compounds with Polymeric Adsorbents", U.S. Patent 3,798,876 (March 26, 1974)

41. Kennedy, D. C. and Paleos, J., "Fuel Evaporative Emission Control Based on Polymeric Adsorbents", U.S. Patent 3,805,493 (April 23, 1974)

42. Adams, J. et al, "Selection and Evaluation of Sorbent Resins for the Collection of Organic Compounds", U.S. Environmental Protection Agency Report Number EPA-600/7-77-044, April 1977

I. Analytical Techniques (See also references 4, 7, 12, 15, 17, 18 and 20)

43. Scoggins, M. W. and Miller, J. W., "Rapid Separation Technique for Mono- and Disulfonic Acids", *Analytical Chemistry, 40*, pp 1155-1157, June 1968

44. Junk, G. A. et al, "Applications of Resins for Extracting Organic Components from Water", *Z. Anal. Chem., 282*, pp 331-337, 1976

45. Pietrzyk, D. J. and Chu, C., "Amberlite XAD Copolymers in Reversed Phase Gravity Flow and High Pressure Liquid Chromatography", *Analytical Chemistry, 49*, pp 797-764, May 1977

46. Pietrzyk, D. J. and Chu, C., "Separation of Organic Acids on Amberlite XAD Copolymers by Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography", *Analytical Chemistry, 49*, pp 860-867, May 1977

47. Glaze, W. H. et al, "Total Organic Halogen as Water Quality Parameter: Adsorption/Microcoulometric Method", *Environmental Science and Technology, 11*, pp 685-690, July 1977

48. Chriswell, C. D. et al, "Comparison of Macroreticular Resin and Activated Carbon as Sorbents", *Journal American Water Works Association*, December 1977, pp 669-674

Amberlite® XAD-2

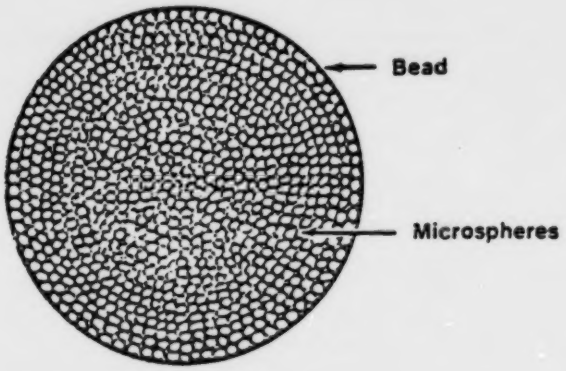
Amberlite XAD-2 is a polymeric adsorbent produced as white insoluble beads for use in columns or in batch operations to adsorb soluble organic compounds from aqueous streams and organic solvents. This hydrophobic adsorbent is an insoluble crosslinked polystyrene copolymer, supplied as beads in a 20 to 60 mesh size range. This product is further characterized by its unique macroreticular porosity, its broad pore size distribution and high surface area, as well as a chemically homogeneous nonionic structure which differentiates it from most other adsorbents. It has unusually good physical durability and consequently it can be used in cyclic columnar operations. Amberlite XAD-2 has good thermal stability and can be used at temperatures as high as 200°C.

Amberlite XAD-2 is used commercially to remove antibiotics, organic nitrogen, grease and various aromatic compounds from aqueous streams. In addition, this resin is also used to remove various organics from hydrogen peroxide and compounds that impart color to alkanol amines.

Amberlite XAD-2 is also used in sensitive analytical procedures to detect, identify and measure the presence of pesticides and other organics in the environment. It is also used to detect narcotics in blood and urine, and is employed to concentrate organics for further analysis by gas chromatography and other methods.

process of adsorption

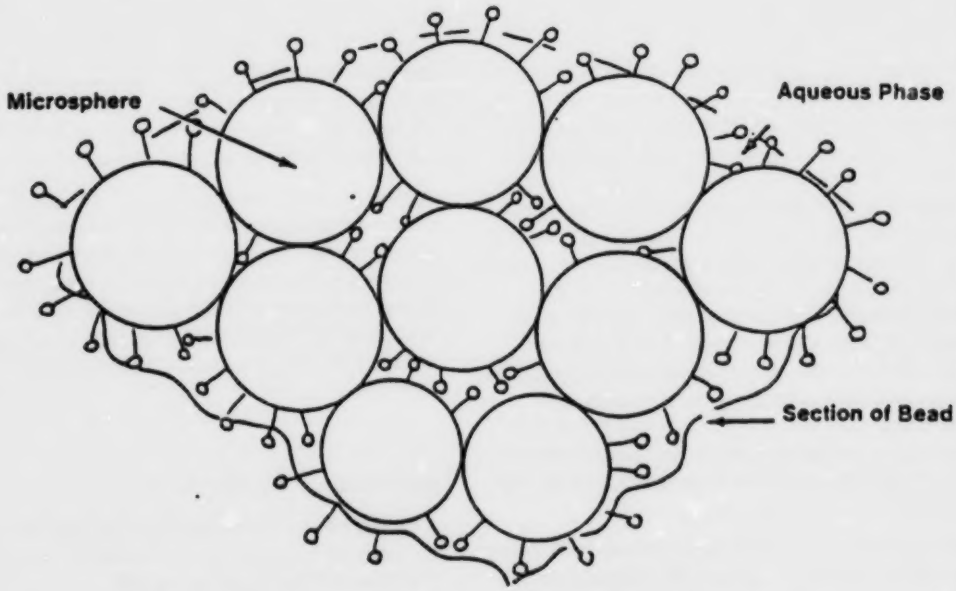
A single bead of Amberlite XAD-2 can be considered schematically to have a physical structure of the following nature:



A single bead consists of an agglomeration of a large number of very small microspheres. The porous structure is of an open-cell variety so that water can readily penetrate the pores. Amberlite XAD-2 has a continuous gel phase and a continuous pore phase.

In the adsorption process the portion of the molecule which has little affinity for water, i.e., the hydrophobic portion, is preferentially adsorbed on the hydrophobic polystyrene surface of the adsorbent, while the hydrophilic section of the molecule will remain oriented in the aqueous phase.

Schematically, the adsorption phenomena can be pictured as follows for an enlarged section of the bead, using a typical sorbate molecule (———o) containing a hydrophobic section (———) and a hydrophilic section (o):



Studies conducted to date suggest that the materials being adsorbed do not ordinarily penetrate substantially into the microsphere phase, but remain sorbed at the surface. Therefore, with proper elution or regeneration techniques, the adsorbate can be rapidly eluted because of the high rate of diffusion of the eluting agent through the porous structure of each bead. Since the sorbate is bound to the outer and inner surfaces of the resin beads, penetration or solvation of the microspheres by the eluting agent is neither involved nor necessary.

The selectivity and extent of adsorption of soluble organic compounds by Amberlite XAD-2 increases as the hydrophobicity of the organic molecule increases. The high degree of selectivity for hydrophobic materials by Amberlite XAD-2 is shown later in an illustration of its application for the adsorption of a series of fatty acids varying in their degree of hydrophobicity.

The adsorption forces involved with Amberlite XAD-2 are primarily of the van der Waals' type. This has the advantage that, by changing the hydrophobic/hydrophilic balance of the molecule adsorbed, one can change the extent of its adsorption. For example, weak acids are more strongly adsorbed in the acid form than the salt form. Consequently, weak acids can be eluted from Amberlite XAD-2 with caustic soda.

Similarly, other natural acids, including fulvic acid, can be effectively adsorbed as the acid and eluted with caustic soda. Fatty amines are likewise strongly adsorbed in the free base form and can be eluted with acid.

With other materials, such as alkyl benzene sulfonate (ABS), regeneration can be achieved by the use of hot water. In this case, the ABS is more soluble at higher temperatures and, consequently, has less affinity for the sorbent surface. In other cases, polar solvents of polar solvent-water mixtures are very effective eluants. Because these solvents have a greater affinity for the sorbate than does Amberlite XAD-2, effective elution of the sorbate is achieved.

properties

Amberlite XAD-2 is a commerical product, the physical characteristics of which can be expected to conform closely to the following typical properties listed in Table I.

applications

Amberlite XAD-2 is particularly useful in separating, from aqueous solution, an organic substance having hydrophobic and hydrophilic

table I: typical physical properties of Amberlite XAD-2

Property	*Amberlite XAD-2*
Appearance	Hard, spherical opaque beads.
Solids %	55
Porosity (ml pore/ml bead—dry basis)	0.42
Surface Area (m^2/g—dry basis)	300
Effective Size (mm.)	0.4
Average Pore Diameter (Å-dry basis)	90
True Wet Density undistilled water (g/ml)	1.02
Skeletal Density (g/ml)	1.07
Bulk Density (lbs/ft^3)	40 (640 g/l)
Hydraulic Expansion	See Figure 1
Pressure Drop	See Figure 2

sections in its molecular structure. Amberlite XAD-2 is especially effective for the separation of surface active agents, including detergent components, emulsifiers, wetting agents, and dispersants, such as those present in the waste streams of various industrial plants, including laundries, chemical manufacturers, dyers, canneries, and pharmaceutical companies.

Amberlite XAD-2 is also suitable for the recovery and concentration of water soluble steroids, enzymes, amino acids, polypeptides, and proteins from various aqueous process streams, including those derived from fermentation, biosynthesis, or organic synthesis.

The technical staff of the Fluid Process Chemicals Group, Industrial Chemicals North America, Rohm and Haas Company will be happy to discuss your application with you.

The following are but a few of the separations that can be accomplished with Amberlite XAD-2.

surfactant removal from water

anionic surfactant (ABS)

A total of 180 ml. of a solution which contained one percent of sodium alkyl benzene sulfonate (ABS) (and also one percent of other impurities, chiefly Na_2SO_4) was passed at room temperature through a 1 cm. (diameter) x 57 cm (height) column containing 50 ml of Amberlite XAD-2 at a flow rate of 0.067 ml/cc/min (0.5 gpm/ft³). Analysis of the effluent fractions showed that a total of 0.018 g of the detergent was not adsorbed, indication that 1.78 g or 99% of the material was removed by Amberlite XAD-2. Elution of the detergent was carried out with methanol. 86% of the ABS was eluted in the first 1.2 bed volumes of effluent, and 96% (1.71 g) was eluted with 2.0 bed volumes of methanol.

One hundred bed volumes of a 500 ppm ABS solution were passed at room temperature through a 50 ml column of Amberlite XAD-2 at a 0.2 ml/cc/min (1.5 gpm/ft³) flow rate. A total of 2.16 g or 88% of the surfactant was adsorbed on the resin in the column. Regeneration of the resin with 30 bed volumes of 90°C deionized water removed 0.97 g or 45% of the ABS which had been previously adsorbed.

nonionic surfactant adsorption (Triton X-100)

A 5.0 g sample of hydrated Amberlite XAD-2 (2.62 g dry) was placed in contact with 100 ml of a 10,000 ppm Triton X-100 (octyl phenol condensed with 10 moles of ethylene oxide) solution. The sample was put on a mechanical shaker and vigorously agitated at room temperature for 24 hours. The equilibrium solution concentration was 252 ppm. Amberlite XAD-2 adsorbed 0.37 g of Triton X-100 per gram of dry resin.

cationic surfactant adsorption (Hyamine 3500)

A 5 g sample of hydrated Amberlite XAD-2 (2.62 g dry) was placed in a solution containing 100 ml. of 10,000 ppm Hyamine 3500 [dimethyl benzyl alkyl (C_{12}-C_{14}) ammonium chloride]. The solution was vigorously shaken for 24 hours and allowed to reach equilibrium at room temperature. Spectrophotometric analysis revealed that the final concentration of the solution was 7,000 ppm. which means that Amberlite XAD-2 adsorbed 0.115 g of Hyamine 3500 per gram of dry resin.

steroid purification

200 ml of a solution which contained 10,000 ppm each of sodium cholate and sodium chloride were passed though a 50 ml column of Amberlite XAD-2 at room temperature at a 0.134 ml/cc/min (1 gpm/ft³) flow rate. A total of 1.60 g of sodium cholate, or 80% of the feed to the column, was adsorbed. Amberlite XAD-2 was treated with one bed volume of water followed by one bed volume of ethanol at a 0.067 ml/cc/min (0.5 gpm/ft³) flow rate. 18% of the steroid was eluted by the water, whereas a total of 97% was eluted when water was followed with ethanol. An additional bed volume of ethanol removed another 2% of steroid. No measurable amount of chloride was detected in the ethanol fractions, showing that an extremely efficient separation of sodium cholate from sodium chloride was achieved.

preconditioning of Amberlite XAD-2 for laboratory studies

Prior to use, we recommend a preconditioning treatment to remove all traces of preservative agents and residual monomeric compounds from Amberlite XAD-2. After the beads are placed in a column containing water, additional water should be passed upflow through the column at a rate sufficient to expand the bed by about 50%. This will classify the beads according to size, thereby allowing more uniform flow through the bed during subsequent cycles. Backwash should be continued for about 10 minutes, or until complete classification is achieved.

Following backwash, the water should be drained from the column, taking care to retain at least one inch of water above the top of the resin bed. It is recommended that 4 bed volumes of methanol then be passed downflow through the bed at a rate of 0.25 gpm/ft³ of resin (0.033 milliliters per minute per cubic centimeter of resin, or 2 bed volumes per hour). After the methanol rinse, 4 bed volumes of water should be passed downflow through the bed at the same flow rate of 0.25 to completely remove the methanol. Acetone could be used as well as methanol.

It is important that the beads be kept completely submerged throughout these and all succeeding operations. A solution level maintained at about 1 inch above the resin bed will reduce channeling through the beads, and will prevent dehydration of the adsorbent.

hydration of Amberlite XAD-2

Amberlite XAD-2 is supplied as water wet beads. Prolonged exposure to air can result in drying of the resin to such an extent that rehydration becomes necessary. The hydrophobic nature of the adsorbent precludes a simple rewetting procedure. Rather, the dehydrated resin is placed in a column, and methanol (or another water soluble solvent such as acetone) is added to the column in sufficient quantity to completely submerge the resin *(see appendix before proceeding with this step)*. Air bubbles, released from the pores, may evolve at this point. The adsorbent is allowed to soak for 15 minutes, after which the methanol is displaced by an upflow addition of water. Care should be taken to avoid losing the beads from the top of the column. After air bubbles have been removed and the bed has been classified through backwashing as described above, the pre-conditioning treatment is continued, beginning with a downflow methanol rinse, and concluding with a downflow water rinse.

adsorption step

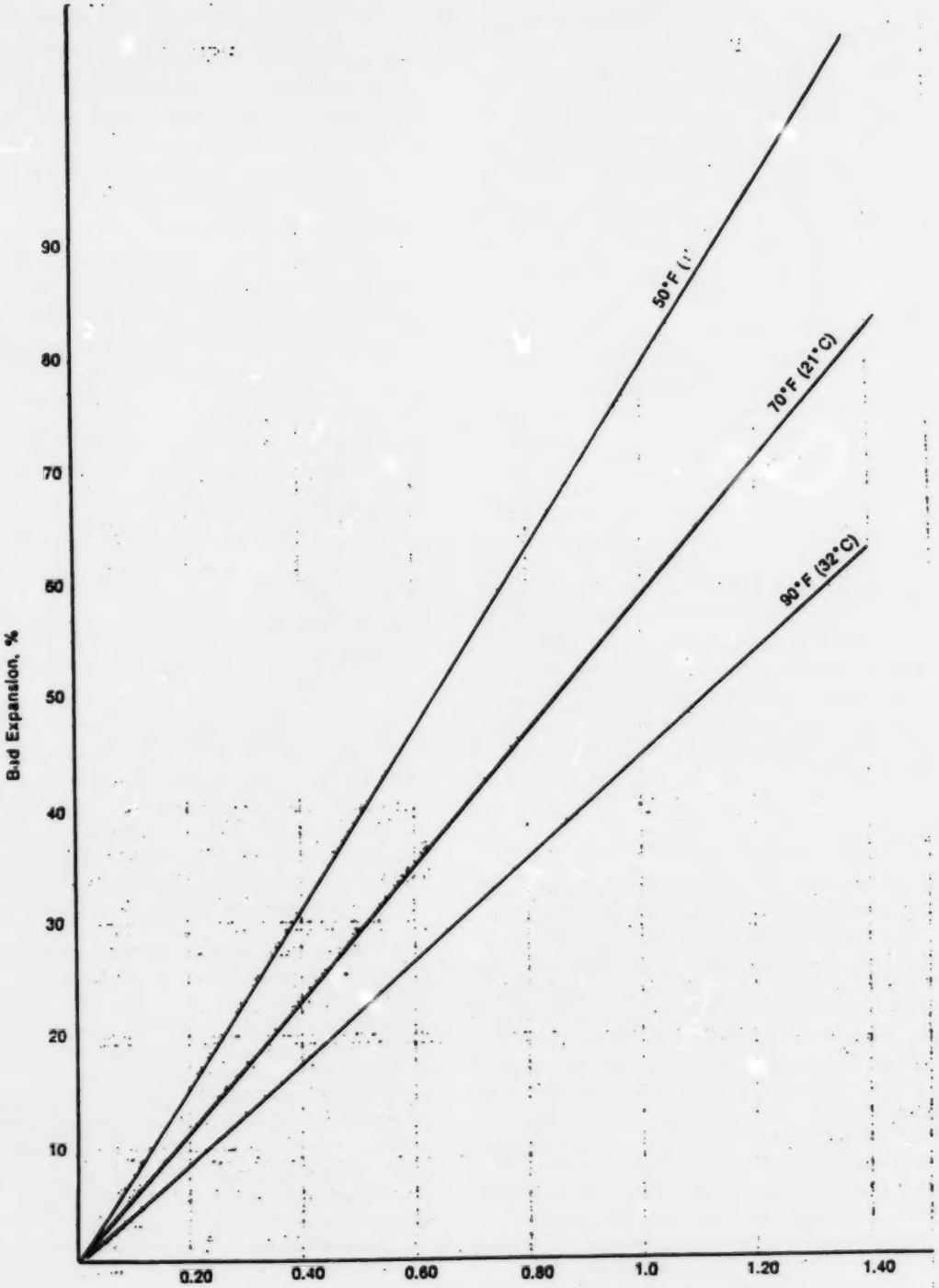
The adsorption portion of the cycle, in which Amberlite XAD-2 is used to remove a solute from an aqueous solution, is typically conducted at a flow rate of 0.25 to 2 gpm/ft³ of resin (0.033 to 0.268 milliliters per minute per cubic centimeter of resin or 2-16 bed volumes per hour). Higher flow rates are possible in systems where the kinetics of adsorption will permit. Lower rates are sometimes necessary to provide sufficient contact time. Preliminary laboratory studies should be conducted at low flow rates to establish that a separation can be effected with later laboratory studies directed toward determining optimum flow rates.

The Appendix contains brief laboratory column test procedures.

fatty acid adsorption

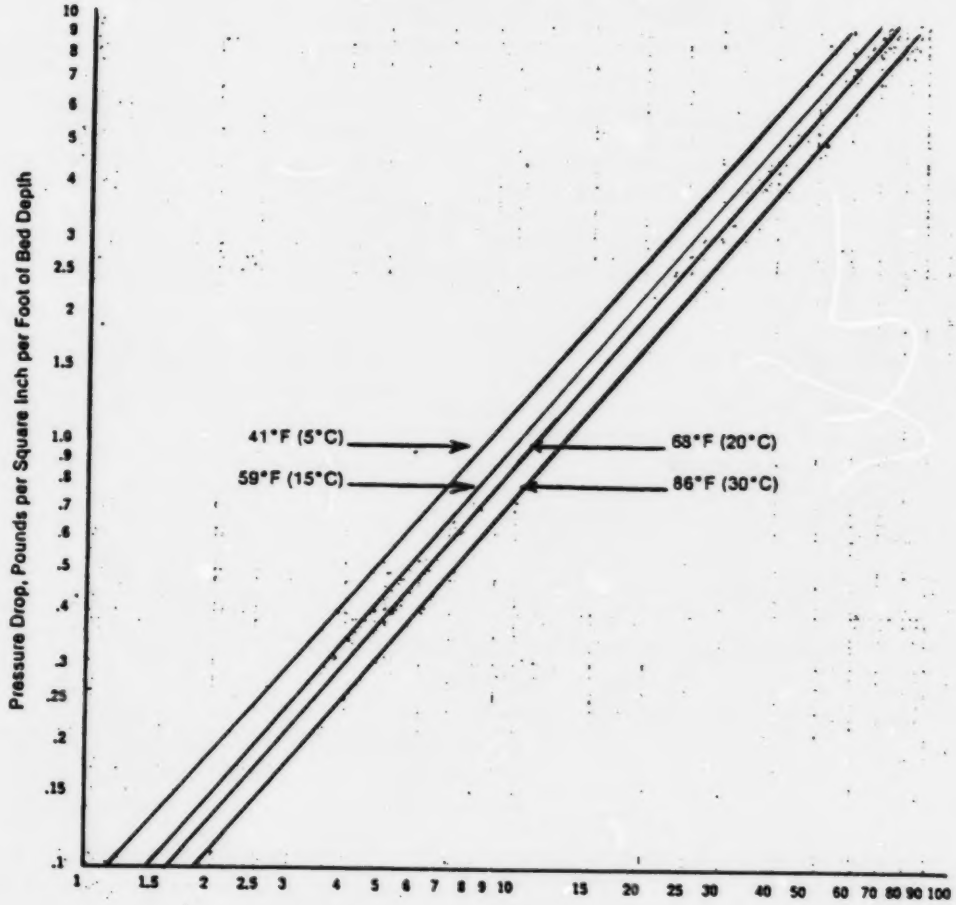
Amberlite XAD-2 is useful for the separation of fatty acids from aqueous solutions. Effective separation is obtained with the higher fatty acids, even though they have but limited solubility in water. As the molecular weight of the fatty acids increases, the degree of adsorption increases.

The effect of increasing chain length of fatty acids upon the degree of adsorption by Amberlite XAD-2 is shown in a comparison of the affinity of Amberlite XAD-2 for propionic, butyric, and valeric acids. When 9.45 g of hydrated (5 g dry) Amberlite XAD-2 were equilibrated at room temperature with 100 ml of solution which initially contained 10 g of fatty acid per liter, 0.040, 0.077, and 0.116 g of propionic, butyric, and valeric acid, respectively was adsorbed by 1 gram of dry resin. In all cases, the adsorption of these acids followed a linear Freundlich isotherm.



Metric Conversion
gpm/ft² to m/hr = gpm/ft² x 2.45

FIGURE 2. PRESSURE DROP AS A FUNCTION OF WATER FLOW RATE THROUGH AMBERLITE XAD-2 (DOWNFLOW)



Metric Conversion
gpm/ft^3 to m/hr = gpm/ft^3 × 2.45
psi/ft to mH_2O/m resin = psi/ft × 2.30

removal of organic contaminants from surface waters

Delaware River water

Amberlite XAD-2 has been studied for the removal of organic matter which is found in natural waters, such as rivers, lakes, and ponds. At a temperature of 15 to 20°C, a 200 ml bed of Amberlite XAD-2 was used to evaluate removal of organics from filtered Delaware River water at a 1.0 gpm/ft³ (8.0 l/l/hr) flow rate. This water had been pretreated with Amberlite IR-120 (H), a strongly acidic sulfonic type cation exchanger, to convert all of the dissolved solids to the respective acids. The following results were obtained:

influent—19 ppm COD (Chemical Oxygen Demand)

Thru-put Bed Volumes	*Effluent ppm COD*
45	6
135	10

fulvic acid

Amberlite XAD-2 was also evaluated for acidic water containing a high concentration of fulvic acid. The water was composed of 1,100 ppm total acid (as $CaCO_3$) and 100 ppm fulvic acid. Seventy bed volumes of this 23°C water (pretreated with Amberlite IR-120, hydrogen form) were passed through the Amberlite XAD-2 at a 1.0 gpm/ft³ (8.0 l/l/hr) flow rate. The Amberlite XAD-2 bed was then regenerated with 5 bed volumes of 1% caustic. This cycle was repeated 7 times, with fulvic acid monitored on each step. The results are listed in the following table.

influent—1,000 ppm total acid (as $CaCO_3$)
100 ppm fulvic acid

Cycle No.	*% Fulvic Acid Sorbed by Amberlite XAD-2*	*% Sorbed Fulvic Acid Eluted During Regeneration*
1	76	102
2	77	97
3	78	100
4	78	94
5	72	108
6	76	101
7	75	98
Average—	76	100

food processing use

Amberlite XAD-2 is not presently approved for use in the commercial processing of food products as required by the provision of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act.

Safe Handling Information

A Material Safety Data Sheet is available for Amberlite XAD-2. To obtain a copy contact your Rohm and Haas representative.

Caution:

Acidic and basic regenerant solutions are corrosive and should be handled in a manner that will prevent eye and skin contact. In addition, the hazards of other organic solvents should be recognized and steps taken to control exposure.

Nitric acid and other strong oxidizing agents can readily react with polystyrene type polymeric adsorbent resins, even at room temperature, and result in exothermic reactions. Before allowing these materials to contact Amberlite XAD-2, consult sources knowledgeable in the handling of these materials.

Amberlite polymeric adsorbents are industrial grade products and are not intended for use in analytical, medical or pharmaceutical applications without extensive purification. It is the user's responsibility to establish the required purity and obtain any appropriate government approval.

Swelling can occur during operations with the macroreticular polymeric adsorbents. The Amberlite XAD-2 structure and high surface areas can result in significant swelling, particularly when nonpolar solvents are employed for conditioning and elution. The swelling that occurs with the use of polymeric adsorbents in narrow glass columns can result in laboratory accidents.

patents and licenses

Rohm and Haas Company holds patents on the use of polymeric adsorbent resins for a variety of process applications. For example, adsorption processes employing polymeric adsorbent resins for certain dissolved organic solutes, including, but not limited to, phenol, nitrophenols, chlorinated phenols, other phenolics, aromatic esters, chlorinated pesticides, antibiotics and surfactants are covered by U.S. patents. Users of these materials for such purposes should obtain appropriate licenses from Rohm and Haas Company. Nonexclusive licenses with single payment, modest royalties are available.

Appendix
Laboratory Column Procedure

experimental

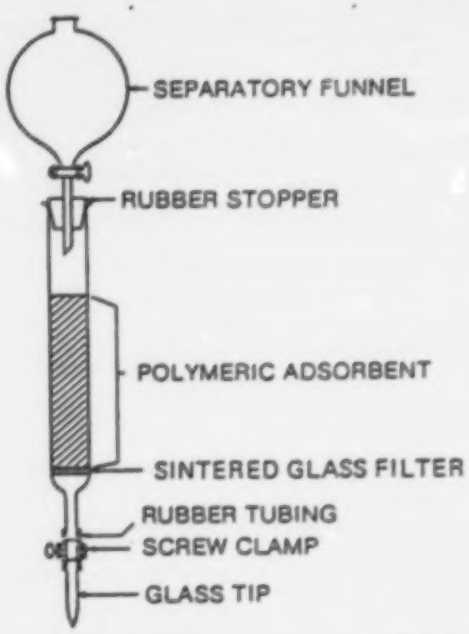
Adsorption applications using Amberlite adsorbents may be carried out by either column or batch techniques. Column operations are usually preferable although the choice of methods depends entirely upon the application in question.

In the treatment of most solutions, the polymeric adsorbent is used in a column to form an adsorption bed. The solution to be treated is allowed to flow through the column until a target end point is reached. At this point, the adsorbent is regenerated to prepare it for another cycle.

An adsorption column may be viewed as a series of equilibrium systems, much like the theoretical plates of distillation theory. As the solution proceeds down the column, the adsorption reaction is continuously driven in the forward direction by the equilibrium requirements of each new theoretical plate encountered.

Various devices may be used for adsorption columns (Figure 3). An ordinary laboratory burette can be used by inserting a small plug of glass wool in the restriction above the stopcock. More permanent columns may be made from glass tubes of various diameters by fusing into the tube a sintered glass filter, and drawing down the tube at the bottom.

Figure 3 ADSORBENT COLUMN



Almost any convenient vessel can be used to hold the stock or regenerant solutions if it is attached to the top of a column having a delivery tube at the bottom with a flow control device such as a screw clamp. The reservoir should always be placed higher than the top of the column and the attachment to the column should be air tight. Separatory funnels are very useful and easy to use since they contain a stopcock which can be used to open and close the flow, and can be set into the top of the column by means of a rubber stopper.

The bed depth of the adsorbent should be maintained at a minimum of 18 inches with greater depth being even more desirable. The size of the column should be chosen so the resin only fills about ½ of the column. This will allow the backwashing procedure to be carried out properly as discussed below.

preparation of laboratory columns

Some precautions should be kept in mind whenever a column operation is to be used. Always fully hydrate the Amberlite polymeric adsorbent resin before charging it to the column and make certain the column contains some water before charging. Never allow a column to become dry. During the course of an experiment be sure to maintain a constant liquid level of at least one inch over the bed. If it is necessary to interrupt the column run be sure to shut off both influent and effluent valves and keep the resin completely submerged.

preparation of the resin

Normally, Amberlite polymeric adsorbents are rinsed with dilute sodium chloride and sodium carbonate solutions before packaging in order to control bacteria and mold growth during storage. These preservatives and residual monomeric compounds should be rinsed from the resin with water, and then with the regenerant that will be used for the process. If a solvent is used for regeneration, it should be washed from the column and the resin rehydrated with water so the solvent does not adversely affect the adsorption step.

Use of the Amberlite adsorbent resin in analytical procedures requires solvent washing to insure complete removal of the residual monomeric compounds—acetone and methanol are most commonly used.

charging the resin into the column

Water should be used to transfer the Amberlite polymeric adsorbent resin to the column. The column itself should contain some water at the start of the operation, and the Amberlite polymeric adsorbent resin should be poured into the column as a water slurry, using a beaker or other vessel. The following steps should be followed in charging resins properly:

1. Add resin-water slurry to a column containing some water.
2. Occasionally drain excess water through the bottom of the column.
3. Do not permit the liquid level to fall below the resin level.
4. Continue adding in this manner until all resin is transferred.
5. Do not fill columns above about half way.

backwashing

The following procedure frees the bed of entrapped air pockets, classifies the resin particles, and rids the bed of debris and resin fines:

1. Attach a water line to the bottom of the column.
2. Introduce water upflow very slowly.
3. Increase the flow until the bed of resin expands approximately 100%.
4. Maintain this flow until all air pockets are removed and all the particles have achieved mobility. (Extremely small particles may be allowed to pass out of the column.) This step is most important and, if performed correctly, will result in good particle size classification with the smaller particles at the top, the larger ones at the bottom portion of the column.
5. Stop the flow of water and permit the resin to settle by gravity.
6. Adjust the liquid level to one inch or more above the top of the bed.

operation of the column

After the resin has been charged to the column, backwashed and settled correctly, and the liquid level adjusted, the resin volume should be measured. It is most convenient to use pre-calibrated columns or burette-type columns because the volume can be read directly. The volume of resin under these conditions is termed a bed volume. It includes the spaces between particles.

flow rates

Exhaustion Step—2 to 12 bed volumes per hour.

Regeneration Step—1 to 2 bed volumes per hour.

Rinse Step—The same as regeneration for two bed volumes. The first bed volume of rinse water should be applied at the regeneration flow rate since this actually represents the completion of regeneration.

NOTE: A simple way to measure flow rate is to periodically collect some of the effluent in a graduated cylinder while checking the time with a stop watch. With permanent columns, flowmeters can be fitted into the effluent line.

volumes of solutions

Backwash Step—Use as much as required to achieve classification and removal of accumulated solids.

Regeneration Step—Use 4 bed volumes in typical systems. Much less can sometimes be used, especially when part of the spent regenerant can be used again. A regenerant eluate curve (concentration of sorbates in regenerant as a function of time) will describe the efficiency of regeneration.

Further information on the Amberlite polymeric adsorbents are available in the technical bulletin:

"Laboratory Column Procedures for Testing Amberlite Polymeric Adsorbents"

ANNEXE 4

PROTOCOLE DU NRC (1982) POUR ANALYSER LA TOXICITÉ D'UNE EAU CONTAMINÉE PAR UN MÉLANGE COMPLEXE DE MICROPOLLUANTS

L'annexe 4 présente une synthèse des différentes phases que doivent comprendre les tests de toxicité lorsqu'ils sont appliqués au contexte d'une eau contaminée par des micropolluants.

Il est à noter que les annexes 5 et 6 donnent des précisions sur le test de Ames (toxicité in vitro), alors que l'annexe 7 se rapporte aux tests de toxicité in vivo.

Quality Criteria For Water Reuse

Panel on Quality Criteria for Water Reuse
Board on Toxicology and Environmental Health Hazards
Assembly of Life Sciences
National Research Council

NATIONAL ACADEMY PRESS
Washington, D.C. 1982

Table 7-1

TOXICITY TESTS

PHASE 1

Conventional Water	Reused Water
In Vitro Tests	
Mutagenicity In vitro transformation	Mutagenicity In vitro transformation
In Vivo Tests	
Acute toxicity Teratogenicity Short-term, repeated dose studies -- 14 day (includes in vivo cytogenetic assay)	Acute toxicity Teratogenicity Short-term, repeated dose studies -- 14 day (includes in vivo cytogenetic assay)

Comparative Analysis

1. Negative results (no detectable toxicity) in all assays on both water sources: Proceed to Phase 2.

2. Positive results[a] in Phase 1 assays on reused water and negative results on conventional water indicate health risks are greater for reused than for conventionally treated water. Options include the following:
   a. Review treatment process and make improvements;
   b. do not use water for human consumption; or
   c. use reused water for human consumption during emergencies only.

3. Positive results[a] on conventional water and negative results on reused water indicate health risks are less for reused water and testing should proceed to Phase 2. The assumption is made that use of conventional water represents an acceptable risk by local and federal authorities.

4. Positive results[a] on both types of water: Quantitatively determine the levels of potency, and ascertain if reused water represents a greater or lesser health risk. If the response is less with reused water and conventional water is believed to represent an acceptable risk, proceed to Phase 2 testing. If health risks are greater for reused water, then options under 2 (above) should be considered.

[a]Positive results should be interpreted by individuals with expertise in the various aspects of toxicology represented by the tests. The following factors must be considered when positive results are obtained:
- types and locations of lesions and their differential importance
- severity of lesions in same organs
- response potency (number of animals responding/dose)

Table 7-1 (continued)

5. Positive results in bacterial mutagenicity tests, but negative results in mammalian cell gene mutation, in vivo cytogenetics tests, and in vitro transformation should be properly noted, but need not stop progression of testing into Phase 2. This analysis recognizes the current inability to draw conclusions about potential health risks based on a single positive result in a prokaryotic system.

6. A positive teratogenicity test indicates that the water contains compounds that are potentially teratogenic in humans. Options include the following:

a. Review treatment process and make improvements;
b. do not use the water for human consumption;
c. determine an estimate of risk by comparing the reused water with conventional water, which is assumed to represent an acceptable risk; or
d. use reused water for human consumption during emergencies only.

Comments

1. The effect that any single positive result or group of positive results will have on progression through the several phases of testing should be determined by individuals qualified in the appropriate toxicological sciences.

2. Positive results showing either genotoxicity or transformation activity indicate that the water contains compounds that have potential genotoxic or carcinogenic risk for humans.

3. Positive results[a] in the 14-day, repeated-dose study indicate the water is potentially toxic in humans. Inconclusive results in that study may have to be resolved by a longer period of testing such as the subchronic 90-day Phase 2 study. Options include the following:

a. Review treatment process and effect improvements, or
b. proceed to Phase 2.

PHASE 2

Conventional Water	Reused Water
1. Subchronic 90-day study in at least one rodent species, preferably in two species	1. Subchronic 90-day study in at least one rodent species, preferably in two species
2. Reproductive toxicity	2. Reproductive toxicity

Comparative Analysis

1. Negative results (no detectable toxicity) in both water sources: Proceed to Phase 3.

[a]See footnote a, p. 209.

Table 7-1 (continued)

2. Positive results[a] on reused water concentrates; no detectable toxicity or less severe effects with concentrates from conventional water: Reused water represents a greater health risk than does conventional water. Options include the following:

   a. Review treatment process and effect improvements, if possible;
   b. do not use water for human consumption; or
   c. use reused water for human consumption during emergencies only.

3. Positive results[a] on conventional water and negative results on reused water: Health risks are less for reused water and testing should proceed to Phase 3. The assumption is made that use of conventional water represents an acceptable risk by local and federal authorities.

4. Positive results[a] on both types of water: Quantitatively determine the levels of potency and ascertain if reused water represents a greater or lesser health risk. If the response is less with reused water and conventional water is believed to represent an acceptable risk, proceed to Phase 3 testing. If health risks are greater for reused water, then options under 2 (above) should be considered.

PHASE 3

Conventional Water	Reused Water
1. Chronic lifetime feeding study in one species of rodent	1. Chronic lifetime feeding study in one species of rodent

Comparative Analysis

1. Positive results[a] on reused water and negative results on conventional water indicate health risks are greater for reused than for conventionally treated water. Options include the following:

   a. Review treatment process and make improvements;
   b. do not use water for human consumptions; or
   c. use reused water for human consumption during emergencies only.

2. Positive results[a] on conventional water and negative results on reused water indicate health risk are less for reused water. The assumption is made that the use of conventional water represents an acceptable risk by local and federal authorities.

3. Negative results in both sources indicate that the risk is no different within limitations of methods.

[a]See footnote [a], p. 209.

water must also be made on the basis of statistically significant and reproducible differences derived from test results on equal weight of total solutes.

PHASES 2 AND 3 TOXICITY TESTING

These two phases of evaluation deal with cumulative toxicity. Phase 2 consists of a subchronic, 90-day study in a rodent species (preferably in two species, one a nonrodent) and includes an assessment of reproductive toxicity. Phase 3 is a combination cnronic toxicity (including carcinogenicity) study. These two phases of testing are especially important for substances for which there is long-term repeated exposure. An inherent difficulty in these evaluations, as well as in other phases of testing reused water, is a consequence of using concentrates. Caution should be exercised in interpreting these data to ensure that the effects observed are not a phenomenon of the high doses necessary to elicit a response. These mixtures may produce effects that would not be realized if such solutes were present in an unconcentrated form. Recognition of this possibility makes it all the more important that qualified toxicologists evaluate results of all three phases of testing. Dose-response relationships and types of lesions that can result from testing concentrated mixtures need careful interpretation in order to reach reasoned judgments on potential health effects for numans. Depending on geographic location and consequent solute composition, consumption by humans may not entail undue increased risk, whereas other geographic areas may introduce contaminants that pose greater risk to human health.

ANNEXE 5

PRÉCISIONS CONCERNANT LE TEST DE AMES

Please see Page 2, section II-
also Page 5, section V.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY

BERKELEY · DAVIS · IRVINE · LOS ANGELES · RIVERSIDE · SAN DIEGO · SAN FRANCISCO · SANTA BARBARA · SANTA CRUZ

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

BERKELEY, CALIFORNIA 94720

The bacterial strains recommended for use in the *Salmonella*/microsome test are enclosed. These strains have been constructed for testing compounds as mutagens and are sent to any organization upon request. I would like to hear about any new mutagens that your survey uncovers and would particularly appreciate preprints of work done with these strains.

For a detailed description of the procedures used in the test, please refer to the Methods Paper, Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975), Mutation Research 31, 347-364. Recent developments and additional information related to the test are given in the enclosed Supplement to the Methods Paper

IMPORTANT: THE TESTER STRAINS ENCLOSED SHOULD BE PROCESSED IMMEDIATELY. Follow the instructions given in Section I of the Supplement, Processing the Strains.

If you have problems which are not covered in the Methods Paper or in this Supplement, you may call the laboratory on Monday mornings between 9:00 and 12:00 noon (California time), phone (415) 642-5163. Ask for Dorothy Maron. If you need replacement strains, please send a written request and describe the problem you are having with the strains.

Yours truly,

Bruce N. Ames

Bruce N. Ames
Professor of Biochemistry
Tel. (415) 642-5165

BNA/ssk

THE REFERENCES BELOW GIVE THE THEORY AND PROCEDURES FOR USING THE TESTER STRAINS *IN VITRO*.

Ames, B. N., Lee, F. D., and Durston, W. E. (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 782-786.

Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D. (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2281-2285.

Durston, W. E., and Ames, B. N. (1974) A simple method for the detection of mutagens in urine. Studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 737-741.

Kier, L. D., Yamasaki, E., and Ames, B. N. (1974) Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4159-4163.

McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J., and Ames, B. N. (1974) The detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R-factor plasmids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 979-933.

Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31, 347-364.

McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 5135-5139.

McCann, J., and Ames, B. N. (1976) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, discussion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 950-954.

Yamasaki, E., and Ames, B. N. (1977) Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 3555-3559.

McCann, J., and Ames, B. N. (1977) The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. In *Origins of Human Cancer*, H. H. Hiatt, J. D. Watson, and J. A. Winsten, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Donahue, E. V., McCann, J., and Ames, B. N. (1978) Detection of mutagenic impurities in carcinogens and noncarcinogens by high-pressure liquid chromatography and the *Salmonella*/microsome test. *Cancer Research* 38, 431-438.

Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A., and Ames, B. N. (1980) Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4961-4965.

Maron, D., Katzenellenbogen, J., and Ames, B. N. (1981) Compatibility of organic solvents with the *Salmonella* microsome test. *Mutation Research* 88, 343-350.

SUPPLEMENT TO THE METHODS PAPER
(Revised July 1981)

I. PROCESSING THE TESTER STRAINS. DO THIS IMMEDIATELY.

(A) Check Genetic Markers, Spontaneous Reversion, and Mutagenesis with Standard Mutagens.

The paper disc inside each plastic package has been saturated with a nutrient broth culture of the tester strain indicated. It is surrounded with soft agar to prevent drying. Cut across the package with scissors and remove the disc with sterile forceps. Streak the disc across a nutrient broth agar plate for later use and then drop the disc into sterile nutrient broth for overnight growth at 37°C with shaking. (Please read pages 3-4 for a discussion of nutrient broth.) This broth culture is used to make frozen permanents and to check the genetic markers according to the directions in the Methods Paper, Ames, McCann, and Yamasaki (1975) *Mutation Research* 31, 347-364.

The streak made with the paper disc on nutrient agar should be cross-streaked for single colony isolation. This is done to maintain a reserve copy of the tester strain for use in case the broth culture fails to demonstrate the characteristics ascribed to the strain during the check of markers. The agar plate streak should be cross-streaked immediately and the plate incubated overnight at 37°C. It can then be stored in the refrigerator until the nutrient broth culture has been checked. If all the markers are intact and the spontaneous reversion rate and mutagenesis with standard mutagens are confirmed, the reserve plate may be discarded. If the culture does not conform to the specified requirements, pick 4-5 isolated colonies, grow up individually in nutrient broth, and repeat the procedure for checking the markers. Select the isolate with the best overall characteristics for the strain for preparing new frozen permanents.

(B) Frozen Permanents:

To insure a perpetual supply of cultures with intact markers, make at least two sets of frozen permanents for storage at -80°C, following the directions given in the Methods Paper. One set of permanents is for routine use. Another set, the Master Copies, should never be opened except to generate cultures from which new frozen permanents for routine use are made. Each time new permanents are prepared from the Master Copies, it is essential to check the genetic markers, spontaneous reversion rate, and mutagenesis with standard mutagens.

Before freezing the broth culture, spectrophotometric quality DMSO is added. The Methods Paper specifies 0.07 ml DMSO to 0.8 ml culture. It is convenient to do this in one large batch and transfer the mixture of bacterial culture and DMSO to the permanent vials with a sterile Pasteur pipet.

If your Master Copies of the tester strains are lost because of freezer failure, you may obtain replacement strains from us. Please send a written request to Dorothy Maron, Ames Lab, Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, California 94720.

(C) Master Plates:

In addition to frozen permanents, it is convenient to have cultures of the tester strains on agar plates which can be stored at 4°C. Master plates are used routinely in this laboratory as the source of inoculum for overnight cultures used in mutagenesis assays. The use of these plates for routine work avoids the problems which arise when the frozen permanent vials are opened frequently. Surface thawing and re-freezing can damage the bacterial cells and an accumulation of frost on the surface of the frozen culture makes it difficult to get an adequate inoculum.

To prepare the agar for master plates, spread 0.1 ml of 0.1 M histidine and 0.5 mM biotin on the surface of minimal glucose agar plates using a sterile glass spreader. For the R-factor strains, spread 0.1 ml of ampicillin (8 mg/ml) in addition to the histidine and biotin as pressure for retaining the plasmid. The plates should be prepared a day or two before use to allow these solutions to diffuse uniformly throughout the agar. This is imperative in the case of ampicillin which can overwhelm the bacteria if it is concentrated in one portion of the agar.

Grow up overnight nutrient broth cultures from the frozen permanents. Using a sterile wire loop, wooden stick, or cotton swab, transfer some culture to the surface of the agar, making 5 or 6 parallel streaks across the plate. Incubate overnight at 37°C and store at 4°C.

Although master plates can be stored at 4°C for about 3 months before the agar begins to dry out, it is not advisable to use them longer than 1-2 months, and it is essential to keep them cold at all times. In this laboratory, master plates are stored in the cold room and are never removed, even for inoculating cultures. If a cold room is not available, the plates can be stored in a conventional refrigerator, but they should be removed only to inoculate cultures and then replaced immediately. New master plates should be made from the frozen permanents and not from old master plates because of the possibility of losing the *rfa* mutation or the R-factor plasmid through subculturing. Although it is not necessary to re-isolate the strains each time a new master plate is made, it is essential to check out the genetic markers, the spontaneous rate, and mutagenesis with standard mutagens.

II. OTHER METHODS OF STORING TESTER STRAINS:

(A) Liquid Nitrogen: If you do not have a -80°C freezer, you can store the permanent vials in liquid nitrogen.

(B) Conventional Freezers: We have no experience with storage of the tester strains in a conventional freezer. If you have neither a -80°C freezer nor liquid nitrogen, you may as well try using a regular freezer, but it is essential to check the strains frequently. We would like to hear from anyone who has stored the strains successfully at temperatures above -80°C for periods of 1 year or longer.

(C) Preservation of *Salmonella* Tester Strains by Freeze-Drying: Previously we have not recommended this procedure for the preservation of the tester strains because of the *rfa* mutation. Recently, however, we were able to freeze-dry these strains in skim milk suspensions. Survival of the bacteria was good and there was no loss of the genetic characteristics. We have limited experience with the longevity of freeze-dried cultures but TA1CO has survived 12 months, stored at 4°C, so it looks encouraging. Because of the expense of preparing these cultures, we will not be able to send them to other laboratories, but we will be glad to send a copy of the procedure. We will continue to mail cultures of the tester strains in the usual way.

III. PROBLEMS WITH THE TESTER STRAINS:

(A) Spontaneous Reversion Rates:

The Methods Paper specifies the following spontaneous reversion rates for the tester strains: 20 (TA1535), 7 (TA1537), 25 (TA1538), 150 (TA100), 40 (TA98). Although the spontaneous rate varies somewhat from one laboratory to another, it should be relatively consistent within a laboratory. Even so, there will be some fluctuation in the spontaneous rates from one experiment to the next and from one plate to the next within an experiment, particularly with the R-factor strains, TA100 and TA98. Because of this variation, it is advisable to pour at least 3 spontaneous plates for each strain in a mutagenesis assay. This is essential when the compounds tested are weak mutagens.

In our laboratory, the following ranges of spontaneous reversion are considered acceptable for the tester strains (-S9): 10-35 (TA1535), 3-15 (TA1537), 15-35 (TA1538), 30-50 (TA98), 120-200 (TA100).

You may observe a somewhat different range of spontaneous reversion over a long period of time, but you should not have extreme fluctuations from one experiment to the next. A deviation which is obviously outside the acceptable range established in your laboratory should be viewed as an indication that the other characteristics of the strain should be checked. If there are other signs of trouble with a strain, it should be re-isolated from the frozen permanent Master Copy.

Spontaneous rates are affected by the environment in which the strains are grown, and a consistent increase in the spontaneous rate can sometimes be traced to mutagens in the environment. Mutagens from two environmental sources are discussed below:

(1) Ethylene Oxide:. The ethylene oxide used to sterilize petri plates is a mutagen for TA1535 and TA100. If you notice a precipitous rise in the spontaneous reversion rate for these two strains, you might suspect ethylene oxide, as this chemical dissolves in the plastic and should be allowed to dissipate before the plates are used in mutagenesis assays. If you are having problems with TA1535 and TA100 which disappear with the use of glass petri plates, you should assure that ethylene oxide is the cause of the problem and set aside the plastic plates for several months until all traces of this chemical have dissipated.

It is now possible to purchase petri plates which are produced aseptically without the use of ethylene oxide by packaging the plates hot off the molds. These plates, called "Muta-Assay Dishes," are available from Falcon Labs, 1950 Williams Drive, Oxnard, California 93033. Phone (805) 485-8711. Catalog #1028.

(2) Nutrient Broth: Recently we observed an increase in the spontaneous rates for TA1535 and TA100 which were not attributable to residual ethylene oxide in the petri plates. This problem was traced to recent batches of Difco nutrient broth causing mutations in these strains without S9 activation. This results in high "spontaneous" reversion rates of (roughly) 40 for TA1535 and 200-300 for TA100 (see section IV).

The presence of mutagens for TA1538 and TA98 which require S9 activation have also been detected in Difco nutrient broth. See Vithayathil, Commoner, Nair, and Hadyastha (1978), *Journal of Toxicology and Environmental Health* 4, 189-202.

(B) Loss of the R-factor:

A drop in the rate of spontaneous reversion and inability to obtain the expected number of revertants with the appropriate standard mutagens are symptoms of R-factor loss in TA100 and TA98. As this is usually a gradual process, it is possible to monitor the R-factor titer and to prevent the complete loss of the plasmid by growing an overnight culture (from the frozen Master Copy) in oxoid broth to which 25 µg/ml ampicillin has been added.

To determine the proportion of R-factor cells in an overnight culture, dilute the culture geometrically to 10^{-5} with sterile 0.9% NaCl. Plate 0.05 ml, in triplicate, on nutrient agar plates and on nutrient agar plates to which ampicillin has been added (0.1 ml of an 8 mg/ml ampicillin solution, spread with sterile glass spreader and allowed to diffuse overnight). Incubate the plates overnight at 37°C and count the colonies. Compare the average number of colonies on the ampicillin$^+$ plates with the average on ampicillin$^-$ plates. Ideally, they should be the same, or very close, indicating a high R-factor titer.

If it is necessary to re-isolate an R-factor strain, grow up an overnight culture from the frozen Master Copy and streak out on an ampicillin plate. Pick 4-5 isolated colonies for overnight growth in oxoid broth containing 25 µg/ml ampicillin. Check the markers, spontaneous rate, and mutagenesis with standard mutagens. Select the isolate with the best characteristics for the strain and make new frozen permanents and Master Plates.

Do not add ampicillin to broth cultures which are to be used directly in mutagenesis assays.

(C) Loss of *rfa* Marker:

If the tester strains lose their sensitivity to crystal violet, it is an indication that the deep rough mutation has been lost. If this happens, you should write to us for replacement cultures.

To avoid loss of the *rfa* mutation, do not subculture the tester strains.

IV. OXOID MEDIA:

We are now growing the strains in Oxoid Media #2, made in England and available from Oxoid Canada Ltd., 145 Bentley Ave., Ottawa, CANADA K2E 6T7. Phone (613) 226-1318. It is also available from K.C. Biological, P.O. Box 5441, Lenexa, Kansas 66215. Phone (913) 888-5020.

The recipe is 25 g Oxoid #2 per liter of water. No additional NaCl is required. We use 0.1 ml of the oxoid broth culture in the test. We had previously used only 0.05 ml, as the culture density is about double that of a nutrient broth culture, but we find that 0.1 ml gives better mutagenic activity with the standard mutagens. The spontaneous reversion for TA100 (-S9) using 0.1 ml of oxoid broth culture is 160-185.

V. ADDITIONAL TESTER STRAINS:

In addition to the standard tester strains, we have three strains which are useful for particular purposes. We will send these strains out on request, but we have not recommended them for routine testing as we are still comparing them to other new strains which are being developed.

TA98 (deficient + R-factor): TA98 detects mutagens such as malondialdehyde and nitrofurazone which require an intact uvrB repair system and are not detected by the standard tester strains. (Marcus and Ames, unpublished; mentioned in McCann and Ames [1977], *Origins of Human Cancer*, pp. 1431-1450.)

TA1535: This strain is more sensitive than TA1525 or TA100 for hard methylating agents such as dimethylnitrosamine or MMNG.

TA2637 (TA1537 + R-factor): TA2637 is more sensitive than TA1537 for certain frameshift mutagens. (J. Jose [1979] Photomutagenesis by Chlorinated Phenothiazine Tranquilizers, *PNAS* 76, 469-472.) TA2637 is described in our Methods Paper.

VI. SOURCES OF STRAINS NOT IN OUR COLLECTION:

Strains deficient in nitro-reductase: Dr. Herbert S. Rosenkranz, Department of Microbiology, New York Medical College, Valhalla, New York 10595. Phone (914) 347-5671. Ref. Rosenkranz and Speck, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 1975.

Strains containing plasmids other than pKM101: Professor B. A. D. Stocker, Department of Medical Microbiology, Stanford University, Stanford, California 94305.

Strains having both the deep rough character and markers other than those for which Ames has strains: Professor B. A. D. Stocker (address above); Dr. Malcolm Simmon, University of Calgary, Department of Biology, Calgary 44, Alberta, CANADA.

VII. DISCONTINUED STRAINS:

We have discontinued the use of TA1951, TA1531, TA1536, and TA1978 for routine testing and are no longer sending these strains out.

VIII. MUTAGENICITY INFORMATION:

The Environmental Mutagen Information Center (EMIC) provides mutagenicity information, without charge, for any chemical tested in the *Salmonella*/microsome assay or in any other mutagenicity tests which have been reported in the literature. For mutagenicity information, contact Mr. John Wasson, EMIC, Oak Ridge National Laboratories, Oak Ridge, Tennessee 37830. Phone (615) 574-7871.

IX. ANALYSIS OF MUTAGENICITY DATA FOR WEAK MUTAGENS:

Drs. Joyce McCann and Charles Sawyer have been working on a statistical treatment for borderline mutagens. When it is finished a preprint of their paper will be sent to anyone interested. In the meantime, you may contact Joyce McCann for information: Lawrence Berkeley Laboratory, 91 Bolivar Drive, Berkeley, California 94710; phone (415) 486-4193. Other references below:

(1) D. Weinstein and T. H. Lewtas (1978) A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay. *Mutation Research* 51, 433-434.

(2) K. Sorgath (1978) Qualitatssicherung bei der mikrobiologischen Frenzsteff-Testung auf Mutagenitat im Routine-Laboratorium. *Staub-Reinhalt. Luft* 38, 235-236.

(3) A. J. Katz (1979) Design and analysis of experiments on mutagenicity. II. Assays involving microorganisms. *Mutation Research* 64, 61-77.

X. SOLVENTS USED IN THE TEST:

Compounds to be tested for mutagenicity are routinely dissolved in DMSO if they are insoluble in water. For compounds which are also insoluble in DMSO, there is a need for other solvents which are non-toxic to the bacteria and to the microsomal enzymes in the S9 mix. We have screened 34 solvents for compatibility with the *Salmonella* test and have found 12 to be satisfactory. The maximum solvent concentration (µl/plate) that can be used without excessive toxicity to the bacteria or liver S9 enzymes are listed below. The first number applies to the standard plate incorporation assay and the second number applies to the liquid preincubation test: dimethyl sulfoxide [500,200], glycerol formal [500,200], N,N-dimethylformamide [100,100], formamide [200,100], acetonitrile [200,50], 95% ethanol [200,100], acetone [200,100], 1-methyl-2-pyrrolidinone [100,100], ethylene glycol dimethyl ether [100,100], p-dioxane* [200,50], tetrahydrofurfuryl alcohol [100,50], tetrahydrofuran [50,0].

* Ethers such as p-dioxane should be tested with caution because they form peroxides, after which they are more toxic to the bacteria.

XI. LIQUID PRE-INCUBATION:

Some mutagens, such as dimetnyl nitrosamine and the pyrrolizidine alkaloics which cannot be detected efficiently in the standard plate incorporation assay, can be tested using a slight modification of the standard assay in which the test chemical is incubated with S9 mix and bacterial culture before incorporation into the soft agar overlay (1, 2). This procedure has been used extensively by scientists in Japan at the National Cancer Center Research Institute, Tokyo, and at the Institute of Medical Sciences, University of Tokyo. In their experience it gives equivalent or better results than the standard plate assay for the compounds tested (3, 4, 5).

Pre-Incubation Procedure: 0.1 ml of test solution, 0.5 ml of S9 mix, and 0.1 ml of bacterial culture are delivered, in the order given, to sterile glass tubes placed in a metal heating block. The tubes are incubated for 20 minutes at 37°C or for 30 minutes at 30°C. The choice of conditions is purely a matter of convenience, according to the size of the experiment. These two sets of conditions give comparable results (5). The tubes are shaken during the incubation.

The S9 mix used in our standard plate incorporation assay can be used for the liquid pre-incubation procedure. The Japanese group puts additional cofactors in the S9 mix (1, 2) and uses NADPH instead of our NADPH-generating system. There appears to be no particular advantage in using NADPH, but it is used extensively in Japan simply because it is inexpensive there. In general testing 50 µl S9 per plate is used and seems to be a good compromise for detecting a wide range of compounds.

References for Liquid Pre-Incubation:

(1) T. Yahagi, M. Kagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, M. Okada (1977) Mutagenicities of N-Nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Research* 48, 121-130.

(2) M. Kagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Sugimura, M. Ito (1977) Mutagenicities of Cutinoline and Its Derivatives. *Mutation Research* 42, 335-342.

(3) T. Sugimura, S. Sato, M. Kagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi, T. Kawachi (1976) Overlapping of Carcinogens and Mutagens. *Fundamentals in Cancer Prevention*, P. N. Magee *et al.*, eds., University of Tokyo Press, Tokyo/University Park Press, Baltimore, pp. 191-215.

(4) T. Yahagi, M. Kagao, T. Matsushima, Y. Seino, N. Sanamura, A. Shirai, T. Kawachi, and T. Sugimura (1977) An Improved Method for Detecting Mutagens. *Second International Conference on Environmental Mutagens, Edinburgh, July 11-15, 1977.*

(5) T. Matsushima, personal communication, March 1979.

XII. SOURCES OF LABORATORY SUPPLIES AND EQUIPMENT USED IN THE TEST:

This list is not intended to include items common to every chemistry laboratory, such as pH meters, centrifuges, common chemicals, and glassware.

(A) BIOCHEMICALS, ENZYME PREPS, AND NUTRIENT BROTH:

Oxoid Nagle #2 (Nutrient Broth): Oxoid Canada Ltd., 145 Bentley Avenue, Ottawa Ont 6T), CANADA. Phone (613) 226-1318.

Oxoid USA Inc., 9017 Red Branch Road, Columbia, Maryland 21045. Phone (301) 997-2216.

K. C. Biological, P.O. Box 5441, Lenexa, Kansas 66215. Phone (913) 888-5020. #CM57.

Liver S9 Preps: Available commercially from Litton Bionetics. To obtain a brochure, write to Dr. David Brusick, Director of Molecular Toxicology, Litton Bionetics, Inc., 5516 Nicholson Lane, Kensington, Maryland 20795. Phone (301) 881-5400.

Dr. E. Fresenius KG, Chem.-pharm. Industrie, Postfach 1809, D-6370 Oberursel, West Germany.

Aroclor 1254: Monsanto Industries no longer makes Aroclor 1254. It is now available from Analabs, 800 Republic Drive, North Haven, Connecticut 06473. Phone (203) 288-8463.

NADP (Sodium Salt): Sigma #N0505.

D-Glucose-6-phosphate (monosodium salt): Sigma #G7879.

C-Biotin: ICN Nutritional Biochemicals, 26201 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128. Phone (216) 831-3000. #101023.

L-Histidine-HCl (monohydrate): ICN Nutritional Biochemicals, 26201 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128. Phone (216) 831-3000, #101955.

Ampicillin trihydrate: Bristol Laboratories, Syracuse, New York. Phone (315) 432-2000. To obtain ampicillin for research purposes, write to Mr. William Minor, Research Administrator, Bristol Laboratories, P.O. Box 657, Syracuse, New York 13201. He requires your name, the name of your research organization, university, or other institution, and a statement of the purpose for your request.

Dimethylsulfoxide: Schwarz/Mann, spectrophotometric grade #820628 (99.9%); Matheson Coleman & Bell, Spectro quality #MX1454; or Mallinckrodt, SpectrAR #2428.

(B) STANDARD MUTAGENS:

Aflatoxin B_1 -- Calbiochem #121741
9-aminoacridine -- Sigma #A-0510
2-anthrafluorene -- Aldrich #25,550-0
Benzo[a]pyrene -- Aldrich (Gold Label) #18,644-9
ICR-170 -- Polysciences #8703
ICR-191 -- Polysciences #8704 -- also available from Terochem Laboratories Ltd.
Methyl methanesulfonate (MMS) -- Aldrich #12,992-5
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) -- Sigma #N7629
2-nitrofluorene -- Aldrich #11675-4
4-nitro-o-phenylenediamine -- Aldrich #10,809-8
4-nitroquinoline-3-oxide (NQO) -- Sigma #N8141

Calbiochem, P.O. Box 12087, San Diego, California 92112
Polysciences, Inc., Paul Valley Industrial Park, Warrington, Pennsylvania 18976
Terochem Laboratories Ltd., P.O. Box 8188, Station F, Edmonton, Alberta T5H 4P1, CANADA

(C) LARGE EQUIPMENT AND INSTRUMENTS:

Microscope, stereozoom: Bausch & Lomb #31-26-30-73. Bausch & Lomb, Executive Office, One Lincoln First Square, Rochester, New York 14602. Phone (716) 338-6000.

Microscope Illuminator: Bausch & Lomb #31-33-01.

Gyratory Shaker (37° shaking incubator): New Brunswick Scientific Company, model G25.

Automatic Colony Counters: Our laboratory has two colony counters:

3M Model 620: 3M Company, 3M Center Building 53-3, St. Paul, Minnesota 55101. Phone (612) 733-2778. [May be discontinued.]

NBS Biotran II, model C111: New Brunswick Scientific Co., Inc., 1130 Somerset Street, New Brunswick, New Jersey 08902. Phone (201) 846-4690.

Each of these counters has advantages and disadvantages and each should be calibrated to obtain accurate counts. For a description of the procedures for calibrating the counters, see Hansen and Ames, *New Brunswick Microwaves*, June 1977. It is convenient to program the correction factor into a programmable hand calculator.

Incubator: Napco Model 4320, Scientific Products #J1640-2. In our laboratory the incubator sits adjacent to the hood. A 2" flexible vacuum cleaner tube attached to the incubator outlet pipe connects to a low exhaust fan mounted on the hood. When the incubator door is opened, a microswitch turns on the fan creating a differential pressure which moves the air out of the incubator and into the hood.

Mutagen Hood: The National Cancer Institute has set standards for the airflow in laboratory hoods used for mutagenesis assays. Open-faced hoods should have an average linear face velocity of 100 feet per minute.

Manual Colony Counter:

Bactronic Colony Counter, New Brunswick Model C-110. Address above.

Extra High Torque Stirrer: Polyscience Corporation, 6366 Great Point Road, Niles, Illinois 60648. #22P50. To be used with tissue grinder for making liver homogenates.

(2) Items & Suppliers Not Specified:

Pipets and Pipet Accessories:

Pipettors and Tips: Gilson Medical Electronics, Inc., P.O. Box 27, Sales Mart Building, Middleton, Wisconsin 53562. Phone (608) 836-1551.

Pipettors: #P2 0 --- 0-20 microliter
#P200 0 -- 0-200 "
#P1000 0 -- 0-1000 "

Tips: #C-20 (yellow) -- for 0-20 and 0-200 microliter
#C-200 (blue) -- for 0-1000 microliter

Micro Pipets (disposable): Scientific Products

#P4518-5 -- 5 microliter
#P4518-10 -- 10 "
#P4518-20 -- 20 "
#P4518-50 -- 50 "

Micro Pipets (disposable), Accu-Fill 90, Clay Adams, Division of Becton, Dickinson and Company, Parsippany, New Jersey 07054.

#6814 -- 1-2-3-4-5 micro liter

Manostat Accupet (for manual control of 1 ml pipets): Manostat Corp., 570 Lexington Avenue, New York, New York 10018. Phone (212) 593-6262. Fisher #13-681-609.

Accupet, Ultramicro (for manual control of micropipets): Manostat Corp. Fisher #13-681-60A.

Disposable Glass Culture Tubes (for top agar), 13mm × 100 mm. Scientific Products #T1236-4.

1 Dram Glass Vials (to contain mutagen solutions; for use with Pipettman): Scientific Products #B7808-1 (called "culture bottles").

Screw Caps for 1 Dram Vials (teflon-lined; to replace the caps which come with the 1 dram vials): Kimble #45066-C. Scientific Products #T1383-1.

Constant Temperature Block (designed to replace water bath; used to maintain molten top agar), 72 holes for 13 mm tubes: Laboratory Supplies Co., Inc., 29 Jefry Lane, Hicksville, New York 11801. #4004.

Multi Blok Heater (to maintain molten top agar; holds one bottle): Lab-Line #2030. Curtin Matheson #137-455.

Petri Plates (sterilized without the use of ethylene oxide): Falcon Labs, 1950 Williams Drive, Oxnard, California 93030. Phone (805) 485-8711. "Muta-Assay Dishes," Falcon #1028.

Latex Sterile Surgeon's Gloves: Pharmaseal Laboratories, 1015 Grandview Avenue, Glendale, California 91201. Phone (213) 247-8111.

Scherer Medical Scientific, 950 Richards Boulevard, Sacramento, California 95814. Phone (916) 441-0664.

Type #8065 -- size 6-1/2
Type #8035 -- size 8-1/2

Sweat Discs (for test of crystal violet sensitivity): VWR #58431029.

Plastic Vials for Spring 39 (Nunc serum tubes with screw caps, sterile): Cole Scientific #4-1076.

Racks for Nunc Serum Tubes: Cole Scientific #4-300.

Millipore Filter Unit (for filter sterilizing solutions): Millipore #XX10-0020 (0.2 micron membrane). Scientific Products #MXG0-1.

Bunsen Burner (Touch-o-matic): Scientific Products #89735.

Mixer, Vortex Genie: Scientific Products #58223.

Card Programmable Hand Calculator (for correcting colony counts from automatic colony counters): e.g., Texas Instruments SR-52.

Wooden Applicators (to be sterilized, for use as inoculating sticks): Curtin Matheson #061-465.

Tissue Grinder: Piston type teflon pestle (serrated) with stainless steel rod and grinding vessel of borosilicate glass. Arthur A. Thomas Company, P.O. Box 779, Philadelphia, Pennsylvania 19105. Phone (215) 574-4500.

Glass Ampules (for freeze-drying cultures and sealing under vacuum): Vacule, gold band, vitro 200 (Wheaton #551502): Scientific Products.

Oxygen-Gas Torch (for sealing off glass ampules under vacuum): Scientific Products #89710.

ANNEXE 6

MARON ET AMES 1983

L'annexe 6 était constituée par l'article "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test" de Maron et Ames, n'ayant pas reçu l'autorisation de l'éditeur Elsevier Biomedical Press de reproduire l'article sans frais, seulement la table des matières de l'article est reproduite ici.

Mutation Research, 113 (1983) 173–215
Elsevier Biomedical Press

Revised methods for the Salmonella mutagenicity test

Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames

Biochemistry Department, University of California, Berkeley, CA 94720 (U.S.A.)

(Received 3 August 1982)
(Accepted 19 November 1982)

Contents

Summary 174
Introduction 174
The bacterial tester strains 175
DNA sequence specificity 176
Primary tester strains 177
Adjunct strains 177
Procedure for growing cultures 178
Confirming genotypes of tester strains 179
Histidine requirement 179
rfa mutation 180
uvrB mutation 180
R-Factor 180
pAQ1 plasmid 181
Spontaneous reversion 181
Reisolation of tester strains 182
Storage of the tester strains 183
Viability of frozen permanents 184
Master plates 184
Liquid cultures 185
Lyophilized permanents 185
Mammalian liver S9 186
Induction of rat liver enzymes 186
Removal of liver from rats 187
Preparation of liver homogenate S9 fraction 187
S9 from other tissues and animals 188
Stability of frozen S9 preparations 190
Commercial sources of S9 190
S9 recommendations 190
S9 mix 191
Top agar 191
Agar plates 191
The mutagenicity test 192
Plate incorporation test 192
Spot test 193
Positive controls (diagnostic mutagens) 193

0165-1161/83/0000–0000/$03.00 © 1983 Elsevier Science Publishers

Interpretation of results 195
Plate incorporation test 195
Spot test 197
Statistical analysis of test data 198
Modifications of the mutagenicity test 198
Urine assay 198
Desiccator assay 198
Preincubation test 199
Solvents compatible with the Salmonella test 200
Toxicity assay 200
Detection of mutagenic glycosides with fecal extract 201
Cofactors for detecting azo dyes 201
Liver sulfotransferase-PAPS activation system 201
Accelerated growth of His$^+$ revertants 202
Mutagenicity information 202
Disposal of carcinogen and mutagen waste 202
Safety precautions 202
Handling mutagens/carcinogens 202
Handling the Salmonella strains 203
Chemical sources 204
Mutagens and PCB 204
Reagents, enzyme preparations, and nutrient broth 204
Equipment and supplies 204
Acknowledgements 205
Recipes for stock solutions and media 205
References 210

Summary

The methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mutagenicity test were described previously (Ames et al., 1975b). The present paper is a revision of the methods. Two new tester strains, a frameshift strain (TA97) and a strain carrying an ochre mutation on a multicopy plasmid (TA102), are added to the standard tester set. TA97 replaces TA1537. TA1535 and TA1538 are removed from the recommended set but can be retained at the option of the investigator. TA98 and TA100 are retained. We discuss other special purpose strains and present some minor changes in procedure, principally in the growth, storage, and preservation of the tester strains. Two substitutions are made in diagnostic mutagens to eliminate MNNG and 9-aminoacridine. Some test modifications are discussed.

ANNEXE 7

PROTOCOLE D'ANALYSE DE TOXICITÉ IN VIVO RECOMMANDÉ PAR LE "NRC" (1982)

234.

Quality Criteria For Water Reuse

Panel on Quality Criteria for Water Reuse
Board on Toxicology and Environmental Health Hazards
Assembly of Life Sciences
National Research Council

NATIONAL ACADEMY PRESS
Washington, D.C. 1982

The whole animal testing required includes studies for oncogenicity and heritable effects on germ cells in rodent models. Information available at this time indicates that the vast majority of chemicals producing positive results in chromosome-level germ cell assays and in an *in vivo* cytogenetics assay also produces positive results using somatic bone marrow cells. Thus, results in this assay would be a good predictor of anticipated germ cell effects.

In Vivo Tests

The use of laboratory animals for toxicological testing is essential for the ultimate assessment of the possible health effects of reused water. If one is to determine the risks or the possible health hazards of repeated or continuous exposure of humans to reused water, the data obtained from similar exposures of animals should be evaluated in conjunction with the data obtained from short-term *in vitro* and *in vivo* testing for potential mutagenic and carcinogenic effects. Unlike the *in vitro* assays with bacterial or mammalian tissue or cell cultures in which effects on single systems can be tested, toxicological testing in experimental animals can identify the integrated effects of the test material on complex biological systems. Whole animal tests measure the onset and duration of action--which are dependent on such factors as absorption, distribution to critical sites, biotransformation, and excretion--during acute, subchronic, and chronic exposures (National Academy of Sciences, 1975).

The initial *in vivo* test is the determination of acute toxicity. This test is essential to provide a basis to determine acute risk, and is conducted for the following reasons: to develop

a profile of effects (toxicological profile), to establish a relationship between dose and observed effects, to identify target organ toxicity, to provide insight into possible mechanisms of acute toxicity, to provide adequate data to permit comparisons with other compounds evaluated acutely, and to provide data to permit determination of the LD_{50}, if needed. Although the numerical LD_{50} is often used in toxicity comparisons of compounds, this practice is not recommended unless a number of other factors are simultaneously considered. These include the potential for human exposure at high concentrations, the design and implementation of the study, metnod of determination of the LD_{50}, and the slope of the dose-effect relationship. Arguments offered for not conducting an LD_{50} test include (1) the large quantities of material that are necessary if the acute toxicity is low, (2) the inability of acute tests to predict cumulative effects, (3) the limited value of an LD_{50}, and (4) the uncertainty of interpreting an LD_{50} of a complex, uncharacterized mixture. Acute toxicity testing is <u>not</u> equivalent to an LD_{50} determination, and an evaluation of acute effects need not involve determination of an LD_{50}.

The acute toxicity test should be conducted in healthy young adult male and female rodents (rats and/or mice) (National Academy of Sciences, 1977b). There should be at least three doses (one dose per experimental group of five males and five females) selected for their ability to produce a range of effects and mortality, and they should be administered by gavage. If a dose of 5,000 mg/kg body weight (bw) fails to produce compound-related mortality, additional testing is not warranted. A control group, receiving only the

vehicle (distilled water, if possible), should also be included. All animals should be observed frequently during the 14 days following gavage. Onset, duration, and detailed descriptions of effects and time of death must be carefully noted. All animals that succumb during the 14-day period should be necropsied. All survivors should be killed on the 14th day and necropsied. The observation period may be lengthened, depending on the effects produced.

The LD_{50} analysis, if performed, should be determined by an accepted method (e.g., Bliss, 1935; Litchfield and Wilcoxon, 1949).

Short-Term, Repeated-Dose Studies

These studies are usually conducted after acute testing. Whereas acute testing involves effects (immediate or delayed) following single-dose exposure, short-term, repeated-dose studies involve repeated administration of the test substance and observation of effects (usually delayed) due to accumulation of material in tissues or cumulative effects over a limited time. In addition, short-term, repeated-dose studies should provide evidence of target organ toxicity, the nature and development of toxicological effects, and the dose-response relationship between extent of exposure and effects produced. The data should also be used as the basis for the selection of doses for the subchronic (90-day) study in Phase 2 testing.

Short-term, repeated-dose studies should be conducted in acclimated, healthy young adult male and female (nulliparous and nonpregnant) rats or mice. There should be at least 10 males and 10

females per group, at least three dose levels per concentrate, and a control group. The control group should receive unconcentrated conventional water, three groups should receive concentrate from conventional water, and three should receive concentrate from reused water. The number of doses can be increased if results are equivocal (i.e., not dose-dependent). The limiting dose is 1,000 mg/kg bw. The test material should be administered by gavage for 14 or 28 days. Other routes of exposure (dietary, drinking water) should also be considered. The size of the doses used should be based on a number of considerations, including anticipated human exposure levels. The highest dose should produce adverse effects, but not a significant number of fatalities; the lowest dose should not produce evidence of toxicity. The material should be administered daily for 14 or 28 days. Observations, including changes in general appearance, behavior, and physiological functions (e.g., cardiovascular, respiratory, and gastrointestinal functions) should be made at least twice daily for the duration of the study. Body weight and food consumption should be determined weekly.

Clinical observations should be made at the end of the exposure period. These include hematological, biochemical, and cytogenetic analyses (metaphase) of femur marrow cells and urinalyses. Hematological studies include hematocrit analysis, homoglobin count, erythrocyte count, total and differential leucocyte count, and clotting potential (clotting time, prothrombin or thrombroplastin time, or platelet count). Clinical biochemical determinations include analyses of electrolytes, proteins (total, A/G ratio), fasting glucose, serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), serum

glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), ornithine decarboxylase, urea nitrogen, creatinine, and bilirubin. Urinalyses should include measures of specific gravity, reducing substances, pH, and protein and microscopic (crystals, cells) studies.

All animals that die during the study or are killed at the end of the observation period should be necropsied. The following organs should be weighed and organ/body weight and organ/brain weight ratios determined: adrenals, brain, gonads, heart, liver, kidneys, and spleen. Histopathological examinations should be conducted on all tissues with gross lesions or changes in size (because they are likely to be target organs) and on the adrenals, brain, gonads, heart, liver, kidneys, and spleen of the animals receiving the highest dose level and the control group. If differences are observed, the examinations should be extended to the appropriate tissues in the remaining treated groups.

Cytogenetic Study

A small group of male mice or rats (5 to 10 animals) should be included in each test and control group to evaluate the clastogenic activity of the concentrate. At the end of a 7-day dosing period, colcemid should be administered 2 hours before killing the animals, femur bone marrow cells collected, and metaphase analysis performed. Testing results to date indicate that few, if any, substances that produce chromosome-level effects in germ cells would provide negative results in *in vivo* cytogenetics analyses.

Teratological Testing

Teratology is the study of the causes and development of congenital malformations. Congenital malformations are generally defined as anatomical abnormalities present at birth that are lethal or that seriously interfere with normal functions. Abnormalities of this sort are the usual end points in testing for the teratogenic potential of environmental agents. At present, *in vivo* teratological testing in which such end points are scored is accepted as the choice for the greatest relevance. Other procedures for assessing embryologic toxicity, such as various *in vitro* methods or the use of functional end points or minor structural deviations, are considered less dependable than the standard *in vivo* methods; their general reliability rests on at least 20 years of use.

Because mice, rats, and rabbits are well characterized physiologically, economical, and convenient to use, most routine teratological testing is performed with these species. At least two species should be used to test reused water concentrates. Because of their genetic composition, random-bred (outbred) animals are usually preferred over inbred (genetically homogeneous) strains. The reasons cited for using such stocks are their greater vigor and fertility and their genetic heterogeneity--hence, their resemblance to human populations. The vigor and fertility are not compelling, and heterogeneity is probably incorrect. On the other hand, using genetically homogeneous lines of animals presents some clear advantages (Festing, 1979; Kalter, 1978).

It nas usually been found that, among a small number of inbred strains randomly chosen for teratological testing, there exists a

range of susceptibilities. Thus, by the concurrent use of a relatively small number of unrelated strains, two important ends can often be achieved. First, information can be obtained about the range of sensitivities to environmental agents (not only the average sensitivity) that can be present in a species; and, second, sensitive indicators will usually be observed, enabling investigators to make more realistic risk assessments (Kalter, 1981).

A recommended schedule of dosing (National Academy of Sciences, 1977b) is to administer the test material daily from the 6th through the 15th days of pregnancy in rodents and through the 18th day in rabbits, or even later (Collins 1978), so as to include the entire period of organogenesis. This regimen may be reasonable for agents that human beings are exposed to chronically, but an extended period of administration may interfere with evaluation of teratogenic potential, e.g., by causing nonspecific maternal or conceptual toxicity or by promoting or inhibiting metabolism of the test substance.

For these reasons, and also because the concentrates of substances in reused water may be in short supply, the panel recommends that the test material be administered from the 9th through the 13th days of pregnancy in rodents and from the 10th through the 14th days in rabbits because indications of potential for causing major congenital malformations may be obtained by treating the animals for relatively short intervals during the time of maximal teratological sensitivity. The test material should be administered orally, because that is the route by which humans are exposed.

More than 30 years of studies in experimental mammalian teratology nave established two general facts regarding the pattern of the dose-response relationship in fetuses: (1) Almost without exception, all chemicals, if administered at sufficient levels, will have embryotoxic effects. (2) Conversely, embryotoxic substances have operational tnreshold dosages below which adverse effects are not observed in conventional studies (Kalter, 1968; Wilson, 1973).

The primary purpose of teratological testing, therefore, is not to discover whether or not an agent is embryotoxic, but to determine the dose-response curve that can be used to make decisions about tolerable levels of risk to human health. The usual means of achieving this goal is to determine those dosages that are significantly embryotoxic and then, by serially reducing these amounts, to arrive at doses that produce no observable effects.

In instances where quantities of the test materials are limited, as is the case with concentrates of substances in reused water, it may be necessary to proceed otherwise. An alternative procedure might be to base the dosing schedule on expected levels of human exposure and to administer multiples of these levels. This regimen was used in the only teratological study of drinking water concentrates that appears to have been conducted to date (Kavlock et al., 1979). With this procedure, realistic estimates of environmental concentrations must be made, with due recognition of variations in water composition and water consumption.

The induction of malformations in a test species is evidence of potential teratogenicity of the test material in humans. In the absence of malformations, other embryotoxic effects (increased

frequency of fetal death, growth retardation, minor defects, anatomical variants) present difficulties of interpretation, because they can result from nonspecific maternal and/or fetal toxicity or perturbation of fetal homeostatic processes. Such occurrences must be evaluated individually (Kalter, 1981; Kimmel and Wilson, 1973).

PHASE 2 TESTING

Subchronic Toxicity Study (90 days)

This study is conducted to evaluate adverse effects of the test concentrate administered daily to experimental animals for approximately 10% of their lifespan. Such studies are meant to identify target organs, to determine the lowest observed adverse effect level and the highest no observed adverse effect level, and to provide information on cumulation (of effects and of levels in tissues); to evaluate effects on reproductive performance including gonadal function, estrous cycles, mating behavior, conception, parturition, lactation, weaning, and development; and to provide information on neonatal and adult morbidity and mortality.

For this study, the first generation (F_{1a}) of parents (F_0) exposed to the test materials is used. The parents are exposed from weaning until 80-100 days of age, when they are mated, and continues throughout gestation and lactation. Rats or mice are generally used. The duration of exposure for the F_{1a} generation is continuous from conception until 90 days past weaning. Nonrodents should be exposed for 1 year. There is some experimental evidence that toxicity observed in a 90-day toxicity test may correlate well with the results (with the exception of cancer) of a lifetime (i.e.,

chronic) study in rats and dogs (Weil and McCollister, 1963). At least 20 males and 20 female rodents per group should be used. A control group should receive unconcentrated, conventional water; at least three dose groups should receive concentrates of conventional water; and at least three dose groups should receive concentrates of reused water. The group receiving the highest dose should exhibit adverse effects, but a low incidence of mortality. Ideally, the group receiving the lowest dose should show no evidence of an adverse effect. The test materials should be administered daily by gavage for 90 consecutive days (or 1 year for nonrodents). Alternatives to gavage (e.g., dietary or drinking water exposures) should be considered.

Animals should be observed at least twice daily for general appearance, behavior, and physiological functions (e.g., cardiovascular, respiratory, and gastrointestinal functions). The time of onset, the duration, and the extent of effects should be carefully noted. Food consumption (and water consumption when indicated), body weights, and detailed physical findings should be determined weekly. Clinical observations should include: ophthalmological (at onset and termination of the study), hematological, biochemical, and urinary examinations. Hematological studies include hematocrit analysis, hemoglobin and erythrocyte counts, total and differential leucocyte counts, and measures of clotting potential (clotting time, prothrombin or thromboplastin time, platelet count). Clinical biochemical determinations should include assessment of electrolyte balance, carbohydrate metabolism, liver and kidney function, and other tests as determined by the

observations made. These should include analyses of electrolytes, fasting glucose, SGPT, SGOT, serum alkaline phosphatase (SAP), bilirubin, proteins (total and A/G ratio), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, and ornithine decarboxylase. Urinalyses should include measures of specific gravity, reducing substances, pH, and protein and microscopic studies (crystals, cells). Hematological, biochemical, and urinary evaluations should be conducted at 28 and 90 days. All animals that die during the treatment period or are sacrificed at the end should be necropsied. The following organs should be weighed and organ/body weight and organ/brain weight ratios determined: adrenals, brain, gonads, heart, liver, kidneys, and spleen. The following should be removed and preserved for histopathological examination: all gross lesions; brain (three major areas), spinal cord (three levels), and peripheral nerves; pituitary, thyroid, parathyroid, and adrenal glands; thymus and pancreas; gonads, or uterus; trachea and lungs; salivary glands, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, liver, bladder, and spleen; mammary gland; skeletal muscle; sternum, femur, and marrow; and eye and lachrymal gland.

Histopathological examinations should be conducted on all tissues from control animals on all gross lesions and on target organs (if identified from animals) receiving the highest dose. The histopathological examination should be extended to include appropriate tissues in other treated groups if significant findings are observed in the group receiving the highest dose.

PHASE 3 TESTING

Phase 3 consists of a combination chronic toxicity and carcinogenicity study, which may be needed after the 90-day study if it becomes necessary to evaluate potential human health hazards, particularly the carcinogenic potential and other effects associated with lifetime exposure. Long-term chronic tests should be conducted, primarily on the premise that effects of lifetime ingestion by humans cannot be predicted from tests conducted in a short-lived animal for periods considerably less than a lifetime. In conventional toxicological testing, 24 to 30 months has been considered the average lifespan for the rat and 18 to 24 months for the mouse.

For testing the health hazards of reused water, the primary concerns are the effects of exposure to small amounts over a long period. Even if the results are similar to those of the subchronic tests, it is at times necessary to determine if these tests would show increased morbidity or mortality by the end of a lifetime. Ultimately, the lifetime study could be used to estimate the risk to human health presented by chronic ingestion of reused water.

For this study, the F_{1a} generation of parents exposed to the test materials should be used. The duration of exposure of the F_{1a} generation should be continuous from conception until 24 to 30 months of age. The protocol described for the 90-day study should also be used for this study. The ophthalmological examinations should be conducted at the beginning of the study and at 6, 12, and 24 months. The hematological, biochemical, and urinary evaluations should be conducted at 3, 6, 12, 18, and 24 months. The test

material can be administered by gavage, in the diet, or in drinking water (preferred). At least 50 males and 50 females per dose level should be used. There should be a control group and at least three test groups. The doses to be used should be based on data obtained in the 90-day study on an appropriate multiple of the maximum anticipated human consumption (e.g., 100 or 1,000 times greater).

PRACTICAL CONSIDERATIONS FOR CHRONIC TESTING

The lifetime feeding study should provide the definitive test of oncogenicity and other chronic effects of renovated water. A number of practical requirements limit the scope of the test with regard to dose and concentration multiples. To illustrate these limitations, some hypothetical assumptions concerning the concentrates are outlined in Table 5-2. The amounts of solutes in the unconcentrated water must be considered prior to concentration so approximately equimolar concentrates may be prepared. A discussion of these assumptions and limitations follows.

Choice of Maximum Dose to Test Animals

If given as drinking water, the maximum average volume is 25 ml/rat/day. Table 5-3 lists the daily doses for rats. Thus, the relative daily dose ratio is:

$$\frac{\text{Human equivalent to maximum dose to rat}}{\text{Current human intake}} = \frac{2{,}625 \text{ mg/kg}}{6 \text{ mg/kg}} = 437,$$

or approximately 450 times average daily intake.

TABLE 5-2

Assumed Solute Concentrations of Conventional and Renovated Water Concentrate

Sample	Concentration (mg/liter)	
	Total Organics	Total Solids
Conventional Water:		
Unconcentrated	3	300
Concentrated (100 times)	300	30,000
Renovated Water:		
Unconcentrated	6	600
Concentrated (50 times)	300	30,000

TABLE 5-3

Suggested Daily Dose of Drinking Water To Rats

Substance	Dose (mg/rat[a])	(mg/kg[b])	Equivalent Human Dose[c] (mg/70 kg)	Current Human Intake[d] (mg/70kg)
Total Organics	7.5	37.5	2,625	6
Total Solids	750	3,750	262,500	600

[a] 25 ml x 0.3 mg/ml.

[b] $7.5 \times \frac{1,000}{200} = 37.5$; assumes 200 g body weight.

[c] $37.5 \times 70 = 2,625$.

[d] Assumes 2 liter/day of conventional water per 70 kg adult.

The minimum volume of water required for tests in animals using three groups of 50 males and 50 females plus a control group gavaged with conventional water concentrate and reused water concentrate at a volume of 25 ml/rat is summarized in Table 5-4.

Removal of Electrolytes Before Testing

Inorganic elements normally found in drinking water are listed in Table 5-5, along with the average daily intake for the adult rat and the minimal or optimal daily intake.

The actual dose of total solids after concentration is expected to be 750 mg/rat, as compared to 466 mg/rat for the sum of the ions listed. A factor of less than twice the daily average intake of total inorganic compounds in water should not place an excessive physiological stress on the animal. Potassium is the most toxic element. However, it appears unlikely that the additional intake of this element would constitute a large fraction of total inorganic solids in water.

There may be reasons to remove the inorganic solids; for example, to avoid precipitates that might remove some of the organic constituents by adsorption.

Sensitivity of the Chronic Toxicity Test--Statistical Considerations

Because of costs involved, relatively small numbers of rodents are used for each dose level in 2-year chronic studies. Typically, only 50 animals per dose are used. This limits the size of differences in tumor rates that can be detected. Differences in

TABLE 5-4

Minimum Water Requirements for Concentrates

Test Solution	Dose/Rat (ml)	Total Volume per/100 Rats (ml)	Minimum Volume of Original Water Needed (liters)
Conventional Water Concentrate	25	2,500	250
Reused Water Concentrate	25	2,500	125

TABLE 5-5

Average Daily Intake by Rats of Inorganic Elements in Water

Inorganic Element	Average Daily Intake Per Adult Rat[a] (mg)	Estimated Optimal[b] or Minimal Requirement (mg)
Calcium	121	45
Chloride	63	5
Iron	2.4	0.25
Magnesium	28	0.8
Manganese	0.85	0.8
Phosphorus	94	40
Potassium	116	15 male 8 female
Sodium	40	40
Zinc	0.7	0.04
TOTAL	466	143

[a]Ralston Purina Co. 1980. The average intake of solid food is assumed to be 13.5 g/adult rat.

[b]Farris and Griffith, 1967.

tumor rates that can be detected with high probability (approximately 90%) are listed in the Table 5-6 for animals fed either reused or conventional water concentrates. Differences that can be detected with 100 animals per dose group are included to show the gain from increasing the number of animals. For example, with 50 animals per group, if the tumor incidence of animals administered concentrate from conventional water is 5%, then the true tumor rate resulting from renovated water would have to be about 25% or more in order to have a high probability (approximately 90%) of detecting a statistically significant increase in tumor incidence for animals exposed to renovated water. If the difference in tumor rates between the two types of water is less, then there will be a lower probability of detecting this difference.

For the given dose levels, the proportions of animals with tumors will be described for exposures to concentrate from both renovated and conventional water. Table 5-7 gives approximate 95% confidence limits on the relative risk (ratio of tumor incidence with renovated water to the tumor incidence with conventional water) when the observed tumor incidence is the same in both experimental groups. For example, if 10% (5 out of 50 animals) of the animals develop tumors with both the renovated and conventional water, the observed risk is the same. The estimated relative risk is 1; the true relative risk may vary from 0.2 to 4.0. That is, with 95% confidence, the true tumor rate from renovated water may vary from 20% of the tumor rate with conventional water up to 4 times greater when 5 of 50 animals in each group have observable tumors.

TABLE 5-6

Differences in Tumor Rates Detectable with Approximately a 90% Probability Using a One-Sided Test with Type I Error = 0.05

Differences in Tumor Rates (%)			
50 Animals/Dose		100 Animals/Dose	
Conventional Water	Reused Water	Conventional Water	Reused Water
5	25	5	20
10	35	10	25
20	50	20	40

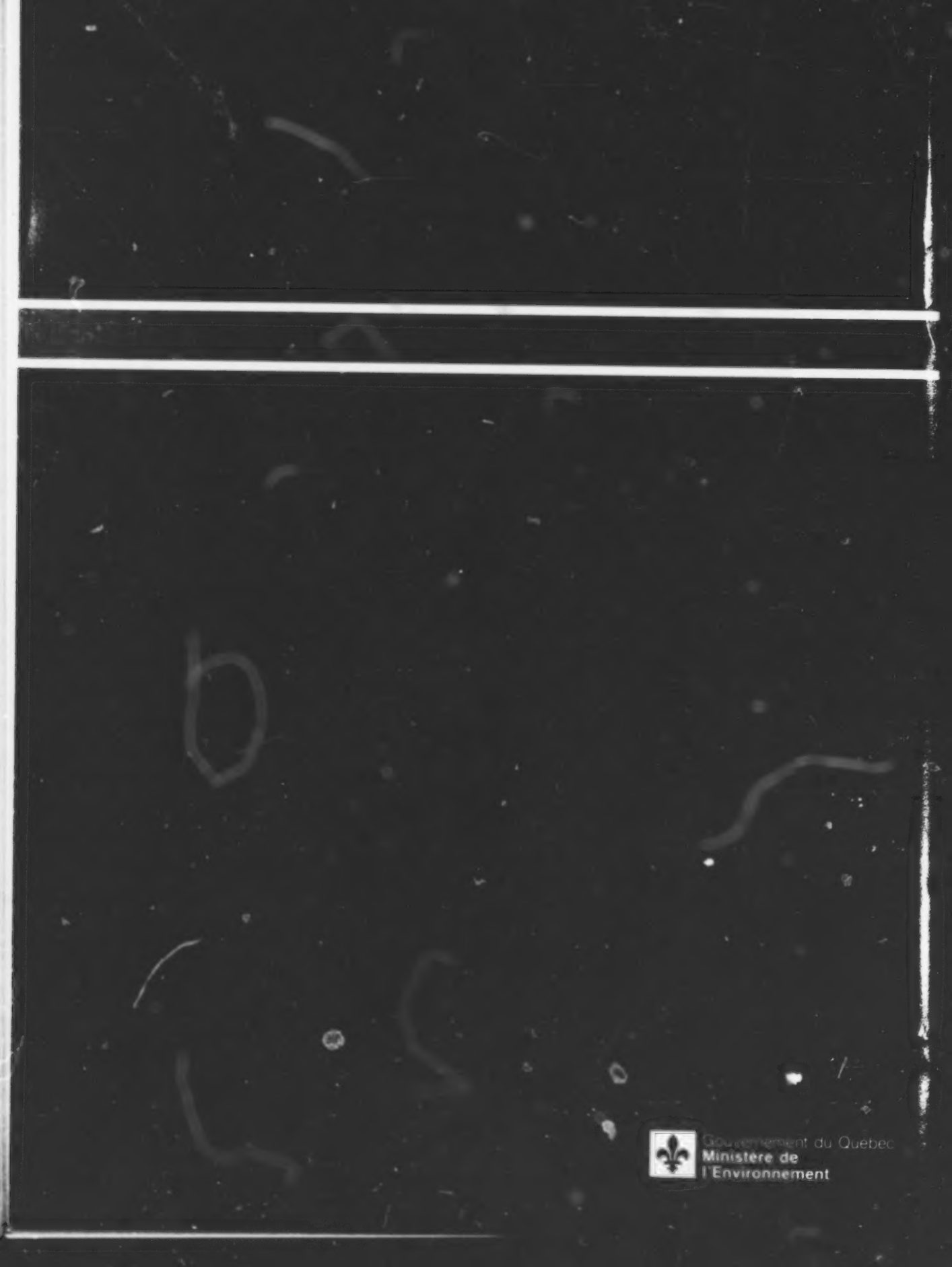
TABLE 5-7

Approximate 95% Confidence Limits on Relative Risk[a]

Proportion of Animals with Tumors in Both Water Types (%)	50 Animals/Group		100 Animals/Group	
	Lower Limit	Upper Limit	Lower Limit	Lower Limit
10	0.2	4.0	0.4	2.6
30	0.5	2.0	0.6	1.6
50	0.6	1.6	0.7	1.3

[a]From Thomas and Gart, 1977.

If there are no differences in responses between male and female animals, it may be possible to pool the data from both sexes to increase the statistical sensitivity. However, it is doubtful that even a pooled analysis could reliably distinguish between, for example, a 5% response frequency from concentrates of conventionally treated water and a 10% response frequency from concentrates of reused water. The above limitations, as well as others, need to be recognized in the design of chronic tests.


Gouvernement du Québec
Ministère de
l'Environnement